

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke

Abteilung Molekulare Genetik

**Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen
mit lichtsensitivem Geschmackssystem zur
Aufklärung der neuronalen Geschmackskodierung**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“

Dr. rer. nat.

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von Kristina Loßow

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2012/5805/>
URN <urn:nbn:de:kobv:517-opus-58059>
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-58059>

Das Auge isst mit.

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Anatomie des Geschmackssinns	2
1.2 Neuronale Kodierung der Geschmacksinformationen	6
1.2.1 Projektionsgebiete von Geschmacksinformationen	6
1.2.2 Kodierung von Geschmacksinformationen	8
1.2.2.1 Kodierung von Geschmacksinformationen in der Peripherie	8
1.2.2.2 Kodierung von Geschmacksinformationen im zentralen Nervensystem	9
1.2.2.3 Kodierung von geschmacksstoffbegleitenden Informationen	11
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und G-Proteine in visuellen und gustatorischen Signalkaskaden	12
1.3.1 Gustatorische Signalkaskade	12
1.3.2 Visuelle Signalkaskade	18
1.3.3 G-Proteine in visuellen und gustatorischen Signalkaskaden	21
1.4 Zielstellung	23
2 Material	24
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	24
2.2 Geschmacksstoffe	24
2.3 Enzyme und Antikörper	25
2.3.1 Enzyme	25
2.3.2 Antikörper	26
2.4 Kits	28
2.5 Plasmide	28
2.6 Oligonukleotide (Primer)	29
2.7 Größenstandards	30
2.8 Lösungen und Puffer	30
2.9 Kulturmedien für Bakterien	33
2.10 Bakterienstämme	34
2.11 Eukaryotische Zelllinien und Materialien für deren Kultivierung	34
2.12 Embryonale Stammzellen und Materialien für deren Kultivierung	35
2.13 Versuchstiere	35
2.13.1 <i>Xenopus laevis</i>	35
2.13.2 <i>Mus musculus</i>	36
2.14 Geräte	36
2.15 Software	38

3 Methoden	39
3.1 Molekularbiologische Methoden	39
3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion	39
3.1.2 Agarosegelelektrophorese	40
3.1.2.1 Gele zur Trennung von DNA-Fragmenten	40
3.1.2.2 Gele zur Trennung von RNA-Fragmenten	40
3.1.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	41
3.1.4 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Glasfasersäule	41
3.1.5 Mikrodialyse	41
3.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	41
3.1.7 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	42
3.1.8 Auffüllen von 5'-Überhängen nach Restriktionsspaltung	42
3.1.9 Phosphorylierung und Hybridisierung von DNA-Fragmenten	42
3.1.10 Ligation linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten	43
3.1.10.1 Ligation mit T4-Ligase	43
3.1.10.2 TOPO-TA/ <i>blunt</i> -Klonierung	43
3.1.11 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion	43
3.1.12 Nukleinsäure-Fällung mit Ethanol	43
3.1.13 Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen	43
3.1.14 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	44
3.1.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
3.1.16 Sequenzierung von DNA	44
3.2 Zellbiologische Arbeiten mit humanen Nierenzelllinien	45
3.2.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen	45
3.2.2 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen	45
3.2.3 Nachweis der Expression transient transfizierter Bitterrezeptoren mittels Immuncytochemie	46
3.2.4 Funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren	47
3.2.4.1 Grundlage von <i>Calcium-Imaging</i> -Experimenten	47
3.2.4.2 <i>Calcium-Imaging</i> -Experimente im Fluoreszenz-Plattenlesegerät	48
3.2.4.3 Auswertung von <i>Calcium-Imaging</i> -Experimenten	49
3.3 Zellbiologische Arbeiten mit embryonalen Stammzellen	50
3.3.1 Kultivierung von Stammzellen	50
3.3.2 Elektroporation von Stammzellen	51
3.3.3 Selektion von Stammzellen mit Geneticin	51
3.3.4 Vereinzelung von Stammzellklonen	52
3.3.5 Splitten von vereinzelt Stammzellklonen	52
3.3.6 Einfrieren von Stammzellklonen	52

4 Ergebnisse	68
4.1 Bestimmung des Ligandenspektrums muriner Bitterrezeptoren	68
4.1.1 Nachweis der Expression transient transfizierter Bitterrezeptoren	68
4.1.2 Funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren der Maus	70
4.2 Funktionelle Charakterisierung von Opsinen durch elektrophysiologische Messungen an <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten	82
4.2.1 Funktionelle Charakterisierung von Opsinen in cRNA-injizierten <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten	82
4.2.2 Funktionelle Charakterisierung von Opsinen in Poly(A)-injizierten <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten	87
4.2.3 Charakterisierung der Lichtsensitivität von Opsinen im <i>Xenopus-laevis</i> -Modell	89
4.3 Generierung von Mausmodellen mit modifiziertem Geschmacksrezeptorlocus	95
4.3.1 Mausmodell Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}	95
4.3.1.1 <i>Targeting</i> -Strategie für Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}	95
4.3.1.2. Generierung des <i>Targeting</i> -Konstruktes Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}	97
4.3.2 Mausmodell Tas1r2 ^{Opsin mws}	99
4.3.2.1 <i>Targeting</i> -Strategie für Tas1r2 ^{Opsin mws}	99
4.3.2.2 Generierung des <i>Targeting</i> -Konstruktes Tas1r2 ^{Opsin mws}	100
4.3.3 Mausmodell Tas2r114 ^{Opsin sws}	103
4.3.3.1 <i>Targeting</i> -Strategie für Tas2r114 ^{Opsin sws}	103
4.3.3.2 Generierung des <i>Targeting</i> -Konstruktes Tas2r114 ^{Opsin sws}	104
4.3.4 Homologe Rekombination der <i>Targeting</i> -Konstrukte in embryonalen Stammzellen	107
4.3.5 Generierung und Rückkreuzung von Chimären	108
4.4. Charakterisierung von Mausmodellen mit modifiziertem Geschmacksrezeptorslocus	113
4.4.1 Charakterisierung des Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP} -Mausmodells	113
4.4.1.1 PCR-Analysen von Geweben der Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP} -Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren	113
4.4.1.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierungen von Zungengewebe der Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP} -Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren	115
4.4.1.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Geschmackspapillen homozygoter Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP} -Nachkommen	117
4.4.2 Charakterisierung des Tas1r2 ^{Opsin mws} -Mausmodells	120
4.4.2.1 PCR-Analysen von Geweben der Tas1r2 ^{Opsin mws} -Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren	120
4.4.2.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierungen von Zungengewebe der Tas1r2 ^{Opsin mws} -Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren	122

4.4.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Geschmackspapillen homozygoter Tas1r2 ^{Opsin mws} -Nachkommen	124
4.4.3 Charakterisierung des Tas2r114 ^{Opsin sws} -Mausmodells	124
4.4.3.1 PCR-Analysen von Geweben der Tas2r114 ^{Opsin sws} -Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren	124
4.4.3.2 <i>In-situ</i> -Hybridisierungen von Zungengewebe der Tas2r114 ^{Opsin sws} -Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren	126
4.4.3.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Geschmackspapillen homozygoter Tas2r114 ^{Opsin sws} -Nachkommen	128
5 Diskussion	130
5.1 Funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren der Maus im Vergleich zu humanen Geschmacksrezeptoren	130
5.2 Erzeugung und Charakterisierung von genetisch veränderten Mausmodellen mit lichtsensitivem Geschmackssystem	140
5.2.1 Nachweis der funktionellen Interaktion von Opsinen mit Gustducin	141
5.2.2 Erzeugung der genetisch veränderten Mausmodelle	145
5.2.2.1 Identifizierung eines homologen Rekombinationsereignis im Geschmacksrezeptorlocus	146
5.2.2.2 Nachweis der Entfernung der Selektionskassette	148
5.2.2.3 Untersuchung der Mausmodelle mit manipuliertem Geschmacksrezeptorlocus	149
5.2.2.4 Nachweis der Funktionalität des IRES-Elementes	153
5.2.3 Funktionelle Charakterisierung und Konsequenzen der Manipulation eines Geschmacksrezeptorlocus im genetisch veränderten Mausmodell	153
5.2.3.1 Funktionelle Konsequenzen des Opsin- <i>Knockins</i>	153
5.2.3.2 Funktionelle Konsequenzen des Geschmacksrezeptor- <i>Knockouts</i>	154
6 Zusammenfassung	158
7 Literaturverzeichnis	159
8 Anhang	181
8.1 Geschmacksstoffe	181
8.2 Oligonukleotide	185
8.3 <i>In-situ</i> -Sonden	193
8.4 Vektorkonstrukte	193
8.4.1 Bitterrezeptorplasmide	193
8.4.2 <i>Targeting</i> -Konstrukte	196
8.5 Funktionalität der <i>In-situ</i> -Sonden und Antikörper für Opsine	202
8.6 Gewebeanalysen der Mausmodelle	203

9 Danksagung	208
10 Eigenständigkeitserklärung	210

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Geschmackspapillen der Maus.</i>	3
<i>Abb. 1.2. Schematische Darstellung einer Geschmacksknospe.</i>	5
<i>Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Projektionsgebiete von Geschmacksinformationen in der Maus.</i>	7
<i>Abb. 1.4. Strukturverwandtschaft und Topologie der TAS2R-Familie des Menschen im Vergleich zur Maus.</i>	14
<i>Abb. 1.5. Schematische Darstellung der molekularen Prozesse bei der Wahrnehmung von Geschmackseindrücken.</i>	16
<i>Abb. 1.6. Zell-Zell-Kommunikation in der Geschmacksknospe.</i>	17
<i>Abb. 1.7. Schematischer Aufbau des Wirbeltierauges.</i>	19
<i>Abb. 1.8. Schematische Darstellung der molekularen Prozesse bei der Wahrnehmung von Licht.</i>	20
<i>Abb. 3.1. Prinzip von Calcium-Imaging-Experimenten in HEK293T-Zellen.</i>	48
<i>Abb. 3.2. Faktoren für die Berechnung des Fluoreszenzsignals $\Delta F/F$ in Rezeptor-transfizierten Zellen.</i>	50
<i>Abb. 3.3. Schematischer Ablauf der embryonalen Stammzellkultur.</i>	51
<i>Abb. 3.4. Schematischer Ablauf der Oozytenexperimente.</i>	66
<i>Abb. 4.1. Expression HSV-markierter muriner Bitterrezeptoren nach transienter Transfektion in HEK293T-Gα.16gust44-Zellen.</i>	69
<i>Abb. 4.2. Aktivatoren des Bitterrezeptors Tas2r114.</i>	73
<i>Abb. 4.3. Fluoreszenzsignale von Bitterrezeptoren der Maus.</i>	76
<i>Abb. 4.4. Fluoreszenzsignale von Tas2r105- und Tas2r144-exprimierenden Zellen.</i>	77
<i>Abb. 4.5. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung ausgewählter Beispiele humaner und muriner Rezeptororthologe.</i>	81
<i>Abb. 4.6. Boxplots der cRNA- bzw. Wasser-injizierten Oozyten nach einmaliger Lichtstimulation.</i>	84
<i>Abb. 4.7. Repräsentative Stomkurven von cRNA- bzw. Wasser-injizierten Oozyten nach einmaliger Lichtstimulation.</i>	85
<i>Abb. 4.8. Repräsentative Stomkurven von Opsin-mws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten nach Inkubation mit verschiedenen Kofaktoren (Retinalen).</i>	86
<i>Abb. 4.9. PCR-Analyse von Poly(A)-RNA auf cDNA-Ebene.</i>	87
<i>Abb. 4.10. Boxplots der Poly(A)-injizierten Xenopus-laevis-Oozyten.</i>	88
<i>Abb. 4.11. Boxplots von Rhodopsin/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-laevis- Oozyten nach Exposition mit Licht variierender Wellenlänge.</i>	90

Abb. 4.12. Boxplots von Opsin-mws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten nach Exposition mit Licht variierender Wellenlänge.	91
Abb. 4.13. Boxplots von Opsin-sws/Gustducin/Phospholipase C-injizierten <i>Xenopus-laevis</i> -Oozyten nach Exposition mit Licht variierender Wellenlänge.	93
Abb. 4.14. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von Rho, IRES und hrGFP unter Kontrolle des <i>Tas1r1</i> -Promotors.	96
Abb. 4.15. Schematische Darstellung der Generierung des Targeting-Konstruktes für die Mauslinie <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> .	98
Abb. 4.16. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von Opsin mws unter Kontrolle des <i>Tas1r2</i> -Promotors.	100
Abb. 4.17. Schematische Darstellung der Generierung des Targeting-Konstruktes für die Mauslinie <i>Tas1r2^{Opsin mws}</i> .	102
Abb. 4.18. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Manipulation der <i>Tas2r114</i> kodierenden Region.	104
Abb. 4.19. Schematische Darstellung der Generierung des Targeting-Konstruktes für die Mauslinie <i>Tas2r114^{Opsin sws}</i> .	106
Abb. 4.20. Southern-Blot-Analyse zur Identifizierung von homolog rekombinierten ES-Zellklonen für die Targeting-Konstrukte <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> , <i>Tas1r2^{Opsin mws}</i> und <i>Tas2r114^{Opsin sws}</i> .	108
Abb. 4.21. Chimäre Nachkommen.	108
Abb. 4.22. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA der <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> -Nachkommen aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Mäusen.	109
Abb. 4.23. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA von <i>Tas1r2^{Opsin mws}</i> -Nachkommen aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Mäusen.	110
Abb. 4.24. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA von <i>Tas2r114^{Opsin sws}</i> -Nachkommen aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Mäusen.	111
Abb. 4.25. PCR-basierte Genotypisierung der Linien <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> , <i>Tas1r2^{Opsin mws}</i> und <i>Tas2r114^{Opsin sws}</i> .	112
Abb. 4.26. RNA-Expressionsanalyse mittels In-situ-Hybridisierung an Pilzpapillen der <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> -Maus im Vergleich zu C57BL/6-Tieren.	116
Abb. 4.27. hrGFP-(<i>Tas1r1</i>)-exprimierende Zellen in den Geschmacksknospen der Mundhöhle der <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> -Maus.	117
Abb. 4.28. Immunhistochemischer Nachweis von Rho in Pilzpapillen der <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> -Maus.	118
Abb. 4.29. Immunhistochemische Analysen zur Koexpression des Fluoreszenzproteins hrGFP mit Zelltypmarkern der Geschmacksknospe in Pilzpapillen der <i>Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}</i> -Maus.	119
Abb. 4.30. RNA-Expressionsanalyse mittels In-situ-Hybridisierung an Wallpapillen der <i>Tas1r2^{Opsin mws}</i> -Maus im Vergleich zu C57BL/6-Maus.	123
Abb. 4.31. RNA-Expressionsanalyse mittels In-situ-Hybridisierung von Wallpapillen der <i>Tas2r114^{Opsin sws}</i> -Maus im Vergleich zu C57BL/6-Tieren.	127

<i>Abb. 4.32. Opsin-sws-(Tas2r114)-exprimierende Zellen in den Geschmacksknospen der Mundhöhle der Tas2r114^{Opsin sws}-Maus.</i>	128
<i>Abb. 4.33. Immunhistochemische Analysen zur Koexpression von Opsin-sws-positiven Zellen mit Zelltypmarkern der Geschmacksknospe in Wallpapillen der Tas2r114^{Opsin sws}-Maus.</i>	129
<i>Abb. 8.1. RNA-Expressionsanalyse von Opsinen im Auge mittels In-situ-Hybridisierung.</i>	202
<i>Abb. 8.2. Immunhistochemischer Nachweis von Opsinen.</i>	202
<i>Abb. 8.3. RT-PCR basierter Nachweis des Tas1r1-Knockouts und des Rhodopsin-hrGFP-Knockins in der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Linie im Vergleich zu C57BL/6.</i>	204
<i>Abb. 8.4. RT-PCR basierter Nachweis des Tas1r2-Knockouts und des Opsin mws-Knockins in Tas1r2^{Opsin mws}-Maus im Vergleich zur C57BL/6-Linie.</i>	205
<i>Abb. 8.5. RT-PCR basierter Nachweis des Tas2r114-Knockouts und des Opsin sws-Knockins in Tas2r114^{Opsin sws}-Mäusen im Vergleich zur C57BL/6-Maus.</i>	206
<i>Abb. 8.6. RNA-Expressionsanalyse des Bitterrezeptors Tas2r105 in Nachkommen der Tas2r114^{Opsin sws}-Linie.</i>	207

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 2.1. Bezugsquellen der verwendeten Geschmacksstoffe.</i>	24
<i>Tab. 2.2. Bezugsquellen der zum Einsatz gekommenen Enzyme.</i>	25
<i>Tab. 2.3. Bezugsquellen und Verdünnungen der zum Einsatz gekommenen Antikörper.</i>	26
<i>Tab. 2.4. Bezugsquellen der verwendeten Kits.</i>	28
<i>Tab. 2.5. Bezugsquellen der verwendeten Plasmide.</i>	28
<i>Tab. 2.6. Bezugsquellen der verwendeten Größenstandards.</i>	30
<i>Tab. 2.7. Bezugsquellen der verwendeten Bakterienstämme.</i>	34
<i>Tab. 2.8. Bezugsquellen der verwendeten Kulturmaterialeien für eukaryontische Zelllinien.</i>	34
<i>Tab. 2.9. Bezugsquellen der verwendeten Kulturmaterialeien für embryonale Stammzellen.</i>	35
<i>Tab. 2.10. Verwendete Geräte und ihre Bezugsquellen.</i>	36
<i>Tab. 2.11. Eingesetzte Software und ihre Bezugsquellen.</i>	38
<i>Tab. 3.1. Mengen und Volumen der für die transiente Transfektion verwendeten Materialien bei unterschiedlichen Plattenformaten.</i>	46
<i>Tab. 3.2. Konditionen der Laserlichtquellen bei Fluoreszenzaufnahmen am konfokalen Mikroskop.</i>	62
<i>Tab. 3.3. Konditionen für Fluoreszenzaufnahmen des hrGFPs am Mirax Scansystem.</i>	63
<i>Tab. 4.1. Aktivierbarkeit von 16 Tas2-Rezeptoren der Maus durch natürliche und synthetische Bitterstoffe.</i>	70
<i>Tab. 4.2. Aktivierung von Tas2r105-exprimierenden Zellen durch Bitterstoffe.</i>	74
<i>Tab. 4.3. Aktivierbarkeit von 16 Tas2-Rezeptoren der Maus im Vergleich zu ihren humanen, orthologen Rezeptoren durch natürliche und synthetische Bitterstoffe.</i>	78
<i>Tab. 4.4. Anzahl und Angaben zur Stärke der Reaktion von cRNA- beziehungsweise DEPC-Wasser-injizierten Xenopus-Oozyten auf einen Lichtstimulus.</i>	83
<i>Tab. 4.5. Anzahl und Angaben zur Stärke der Lichtreaktion von Opsin/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten bei unterschiedlichen Retinal-Kofaktoren.</i>	86
<i>Tab. 4.6. Anzahl und Angaben zum Umfang der Lichtreaktion von Poly(A)/cRNA-injizierten Oozyten.</i>	89
<i>Tab. 4.7. Anzahl und Angaben zur Lichtreaktion von Rhodopsin/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen.</i>	90
<i>Tab. 4.8. Anzahl und Angaben zur Reaktion von Opsin-mws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen.</i>	91
<i>Tab. 4.9. Anzahl und Angaben zur Reaktion von Opsin-sws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen.</i>	93
<i>Tab. 4.10. Anzahl und Angaben zur Reaktion von Wasser-injizierten Xenopus-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen.</i>	94
<i>Tab. 4.11. PCR-Analyse gustatorischer und nicht-gustatorischer Gewebe der C57BL/6- und Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus.</i>	114

<i>Tab. 4.12. PCR-Analyse gustatorischer und nicht-gustatorischer Gewebe der C57BL/6- und Tas1r2^{Opsin mws}-Maus.</i>	121
<i>Tab. 4.13. PCR-Analyse gustatorischer und nicht-gustatorischer Gewebe der C57BL/6- und Tas2r114^{Opsin sws}-Maus.</i>	125
<i>Tab. 8.1. Zuordnung von Substanzklassen und LD₅₀-Werten zu den verwendeten Geschmacksstoffen.</i>	181
<i>Tab. 8.2. Verwendete Oligonukleotide.</i>	185
<i>Tab. 8.3. Verwendete In-situ-Sonden und ihre Hybridisierungs- und Waschkonditionen.</i>	193
<i>Tab. 8.4. Zugrundeliegende Bitterrezeptorsequenzen der Maus in Calcium-Imaging-Experimenten.</i>	193

Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser	bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius	C57BL/6	gezüchteter Mausstamm
%	Prozent		aus einer weiblichen Maus
5-HT	Serotonin		mit der Kodierung 57
5-HT _{1A}	Serotoninrezeptor 1A	ca.	circa
VII. Hirnnerv	<i>Nervus facialis</i>	Ca ²⁺	Calcium
IX. Hirnnerv	<i>Nervus glossopharyngeus</i>	CaCl ₂	Calciumchlorid
X. Hirnnerv	<i>Nervus vagus</i>	cAMP	zyklisches Adenosin-
α	alpha		monophosphat
α- ³² P	Phosphorisotope	CAN	Canada
AADC	aromatische L-Aminosäure-	Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
	Decarboxylase	CCD	<i>charge-coupled device</i>
Abb.	Abbildung	cDNA	komplementäre Desoxy-
ACN	<i>testis specific Angiotensin</i>		ribonukleinsäure
	<i>converting enzyme/</i>	cGMP	zyklisches Guanosin-
	<i>Cre-Rekombinase/</i>		monophosphat
	<i>Neomycin</i>	CH	Schweiz
ad	auffüllen auf...mit...	Cl	Chloroform/Isoamylalkohol
ADP	Adenosindiphosphat	cm	Zentimeter
AFP	<i>across fiber pattern</i>	CMV	humanes Cytomegalovirus
Ala	Alanin	cpm	<i>counts per minute</i>
AM	Acetoxymethylester	Cre	Rekombinase
AMP	Adenosin-5'-monophosphat	cRNA	<i>in vitro</i> transkribierte RNA
AMP R	Ampicillin	CT	<i>Chorda tympani</i>
AP	Alkalische Phosphatase	C-Terminus	carboxyterminales Ende
as	<i>antisense</i>	DAG	Diacylglycerol
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	DBA	<i>non-agouti dilute brown</i>
AVI	Alanin-Valin-Isoleucin	DEPC	Diethylpyrocarbonat
β	beta	d. h.	das heißt
BAC	<i>bacterial artificial</i>	DIG	Digoxigenin
	<i>chromosome</i>	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle</i>
BAPTA	1,2-Bis(O-Aminophenoxy)-		<i>Medium</i>
	Ethan-N,N,N',N'-Tetra-	DMSO	Dimethylsulfoxid
	essigsäure	DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>B-Best</i>	beste Aktivierbarkeit eines	DNase	Desoxyribonuklease
	Neurons durch einen	dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-
	Bitterstoff		Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-	DTA	Diphtheriatoxin A
	indoxylphosphat	DTT	Dithiothreitol
BGH	bovines Wachstumshormon	EC ₅₀	Effektive Konzentration bei
BL	<i>Barley Lectin</i>		halbmaximaler Aktivierung
bp	Basenpaar	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
bspw.	beispielsweise		

EDTA	Ethylendiamintetraessig- säure	ggf. GLAST	gegebenenfalls Glutamat-Aspartat- Transporter
EGCG	Epigallocatechingallat		
EGTA	Ethylenglycol-bis(amino- ethylether)-N,N'-tetraessig- säure	GLP 1 GLUT GMP	<i>Glucagon-like peptide 1</i> Glucosetransporter Guanosinmonophosphat
ENAC	epithelialer Natriumkanal	GNAT2	α -Transducin-Untereinheit der Zapfen
E-PAP	<i>E.coli</i> -Poly(A)-Polymerase		
ER	endoplasmatisches Retikulum	GP GPCR	<i>Ganglion petrosum</i> G-Protein-gekoppelter Rezeptor
ES	embryonale Stammzellen		
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat. und andere)	GPR 40	G-Protein-Rezeptors 40
F	Frankreich	GPR 120	G-Protein-Rezeptors 120
FCS	fötales Kälberserum	GRK1	Rho-Kinase
F _{HR}	Hintergrundfluoreszenz Rezeptor-transfizierter Zellen	GTP Gust h	Guanosin-5'-Triphosphat Gustducin Stunde
F _{HR C1}	Hintergrundfluoreszenz Rezeptor-transfizierter Zellen vor C1-Applikation	h H ₂ O	human Wasser
FLIPR	<i>fluorometric imaging plate reader</i>	<i>H-Best</i>	beste Aktivierbarkeit eines Neurons durch einen Sauerstimuli
for	<i>forward</i>	HCl	Salzsäure
F _R	absolutes maximales Fluoreszenzsignal Rezeptor-transfizierter Zellen nach Testsubstanzapplikation	HEK293 HEPES	humane embryonale Nierenzellen 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfon- säure
F _{R C1}	maximales Fluoreszenz- signal Rezeptor- transfizierter Zellen nach C1-Applikation,	hrGFP	<i>humanized renilla green fluorescent protein</i>
γ	gamma	HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
g	Fallbeschleunigung	HSV	<i>Herpes simplex Virus</i>
g	Gramm	hv	Energie
G418	Geneticin	H-Wert	<i>breadth of tuning</i>
G α	alpha-Untereinheit eines G-Proteins	I	Italien
GABA	γ -Aminobuttersäure	ICC	Immuncytochemie
GC	gustatorischer Cortex	IHC	Immunhistochemie
GC	Guanylylcyclase	Ile	Isoleucin
GCAP	<i>guanylyl cyclase-activating protein</i>	IP ₃ IP ₃ R	Inositoltrisphosphat Inositoltrisphosphat- Rezeptor
GDP	Guanosindiphosphat	IP ₃ R3	Inositoltrisphosphat- Rezeptor 3
GG	<i>Ganglion geniculatum</i>	IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
		ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung

IU	internationale Einheiten	MOPS	4-Morpholinopropan-sulfonsäure
J	Japan		
K ⁺	Kalium	mRNA	<i>messenger RNA</i>
kb	Kilobase	MRT	Magnetresonanztomographie
KCl	Kaliumchlorid		
kg	Kilogramm	MSG	Mononatrium-L-Glutamat
KG	Körpergewicht	mws	<i>medium wavelength sensitive</i>
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat		
Kir	<i>inwardly rectifying potassium channel</i>	N	Normalität
		<i>N.</i>	<i>Nervus</i>
KOH	Kaliumhydroxid	nA	Nanoamper
l	Liter	Na ⁺	Natrium
lacZ	Gen, welches für β -Galactosidase kodiert	NaCl	Natriumchlorid
		NADPH	reduzierte Form von Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid-phosphat
LB	Luria Bertani	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>	Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
LL	<i>labeled line</i>		
LoxP	DNA-Erkennungssequenz für Cre	NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
LRAT	Lecithin:Retinol-Acetyltransferase	NaOH	Natriumhydroxid
lws	<i>long wavelength sensitive</i>	<i>N-Best</i>	beste Aktivierbarkeit eines Neurons durch Salzstimuli
μ A	Mikroamper		
μ Ci	Mikrocurie	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
μ g	Mikrogramm	NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
μ l	Mikroliter		
μ m	Mikrometer	NE	Noradrenalin
μ M	Mikromol pro liter	NEAA	<i>non essential amino acids</i>
m	Meter	neo	Neomycin-Geneticin-Resistenzgen
m	murin		
M	Mol pro Liter	nH	Hill-Koeffizient
mCherry	monomer Cherry	NID	<i>Ductus incisivus</i> (engl. <i>naso-incisior duct</i>)
MCS	<i>multiple cloning site</i>		
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>	NL	Niederlande
MEM	<i>minimum essential Eagle medium</i>	nm	Nanometer
		NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	NPM	<i>Nervus petrosus major</i>
mg	Milligramm		
mGluR1	metabotroper Glutamatrezeptor 1	n.s.	nicht signifikant
		N-Terminus	aminoterminal Ende
mGluR4	metabotroper Glutamatrezeptor 4	NTPdase 2	<i>nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2</i>
min	Minute	NTS	<i>Nucleus tractus solitarius</i>
mM	Millimol pro Liter	OP	äußeres Augensegment

P2X	purinerge Rezeptor P2X, liganden-gesteuerter Ionenkanal	RPE65	retinales Pigmentepithel- spezifisches Protein 65
P2Y1	purinerge Rezeptor P2Y, liganden-gesteuerter Ionenkanal 1	rpm RT -RT +RT	Umdrehungen pro Minute Raumtemperatur ohne reverse Transkriptase mit reverser Transkriptase
P2Y4	purinerge Rezeptor P2Y, liganden-gesteuerter Ionenkanal 4	RT-PCR RTPs	Reverse Transkriptions- PCR <i>receptor transport proteins</i>
Panx1	Pannexin 1	s	<i>sense</i>
PAV	Prolin-Alanin-Valin	s	Sekunde
PbN	<i>Nucleus parabrachialis</i>	SAP	<i>shrimp alkaline</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered salin</i>		<i>phosphatase</i>
PCI	Phenol-Chloroform- Isoamylalkohol	<i>S-Best</i>	beste Aktivierbarkeit eines Neurons durch einen Süßstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PDE	Phosphodiesterase	SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
PDE 1A	Phosphodiesterase 1A	SGLT	<i>sodium glucose linked</i>
PDE6	cGMP-Phosphodiesterase 6		<i>transporter, Na⁺/Glucose-</i>
PEITC	Phenylethylisothiocyanat		Kotransporter
Pen	Penicillin	Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
PFA	Paraformaldehyd	SNAP25	Synaptosom assoziierte Protein 25
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>		
PKA	Proteinkinase A	SNP	Einzelnukleotid- Polymorphismus
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat	SOA	Sucroseoctaacetat
PIPES	1,4-Piperazindiethan- Sulfonsäure	SOC	<i>super optimal broth with</i> <i>catabolite repression</i>
PLC	Phospholipase C	SSC	<i>Saline-sodium citrate</i>
PLCβ2	Phospholipase Cβ2	SSPE	<i>Saline-sodium phosphate</i>
pmol	Picomol	SST	Somatostatin
Pro	Prolin	SSTR2	Somatostatin-Rezeptoren des Subtyps 2
PROP	6-Propyl-2-thiouracil		
PTC	Phenylthiocarbamid	Strep	Streptomycin
RASSL	<i>receptor activated solely by</i> <i>a synthetic ligand</i>	SUR1 SWR	<i>sulfonylurea receptor 1</i> <i>swiss mouse</i>
RDH	Retinol-Dehydrogenase	sws	<i>short wavelength sensitive</i>
REEP	<i>receptor expression</i> <i>enhancing protein</i>	Tab. tACE	Tabelle Testis-spezifischen Cre- Rekombinase
rev	<i>reverse</i>		
Rho	Rhodopsin	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
RNase	Ribonuklease	TAS1R	humaner Geschmacks- rezeptor Klasse 1
ROMK	<i>renal outer medullary</i> <i>potassium</i>	Tas1r	muriner Geschmacks- rezeptor Klasse 1
RPE	retinales Pigmentepithel		

TAS2R	humaner Geschmacks- rezeptor Klasse 2
Tas2r	muriner Geschmacks- rezeptor Klasse 2
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
Th	Thalamus
TNB	Tris-Natrium-Blockier- Lösung
TNT	Tris-NaCl-Tween-Puffer
Trans	Transducin
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
TrpM5	<i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 5</i>
TSA	<i>Tyramid signal amplification</i>
U	<i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
v	Volumen
Val	Valin
vgl.	vergleiche
VIP	<i>vasoaktives intestinales Peptid</i>
VNO	Vomeronasalorgan
Vol.	Volumenteile
w	<i>weight</i> , Gewicht
W	Watt
WI	Winneshiek County, Iowa
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- β-D-galactopyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZMNH	Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

1 Einleitung

Der Geschmack ist ein komplexer Sinneseindruck, der aus dem Zusammenspiel von Geruchs- und Geschmackssinn sowie Tast- und Temperaturinformationen entsteht. Die biologische Bedeutung des gustatorischen Eindrucks im engeren Sinne ist die Regulation der Nahrungsaufnahme und Beurteilung der Nahrungsmittel (Geo, 2007; Rehner & Daniel, 2002). Zum heutigen Zeitpunkt werden fünf Geschmacksqualitäten unterschieden: süß, bitter, sauer, salzig und umami (Lindemann, 1996). Zunehmend wird auch der Fettgeschmack als eigenständige Geschmacksqualität diskutiert (Cartoni *et al.*, 2010; Mattes, 2009; Gaillard *et al.*, 2008; Steward *et al.*, 2011). Geschmackseindrücke wie wässrig, metallisch oder alkalisch als Geschmacksmodalitäten sind hingegen weiterhin umstritten (Lindemann, 1996).

Den Geschmacksmodalitäten werden unterschiedliche physiologische Funktionen zugeschrieben. Die Wahrnehmung von süß oder umami dient der Detektion von zumeist hochkalorischen kohlenhydrat- oder proteinreichen Lebensmitteln. Als süß werden verschiedene Zucker, synthetische Süßstoffe oder süßschmeckende Proteine wie Monellin und Brazzein wahrgenommen (Nelson *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). Umami wurde erstmal 1909 von Kikunae Ikeda beschrieben (Nakamura, 2011). Der Begriff bezeichnet den Geschmack von Mononatrium-L-Glutamat (MSG). Süß und umami sind mit einer positiven Hedonik und der Aktivierung des Belohnungszentrums assoziiert, was einen bevorzugten Konsum jener Nahrungsmittel erklärt. Dem Salzgeschmack wird demgegenüber eine regulatorische Aufgabe im Mineralstoffhaushalt zugeschrieben, während der Sauergeschmack der Wahrnehmung von unreifen und verdorbenen Nahrungsmitteln dient. Die zu Grunde liegenden Mechanismen für die Detektion von salzig und sauer sind bis dato nur unzureichend geklärt. Lange galt der epitheliale Natriumkanal (ENaC) als wichtigster Vermittler des Salzgeschmacks (Stähler *et al.*, 2007). Zwar konnte dessen zentrale Rolle in der Detektion von Natrium (Na⁺) bei Nagetieren bestätigt werden (Chandrashekar *et al.*, 2010), jedoch scheinen beim Menschen noch andere Mechanismen relevant zu sein (Schiffman *et al.*, 1983; Ossebaard & Smith, 1995).

Für den Sauergeschmack belegen neuere Daten, dass Zink-sensitive Protonenströme in spezifischen Geschmacksknospenzellen für die Empfindung sauer verantwortlich sind. Die molekulare Identität des Kanals oder Transporters, der diesen Strom vermittelt, ist derzeit noch ungeklärt (Chang *et al.*, 2010). Darüber hinaus wird vermutet, dass intrazelluläre Versauerung zum aversiven Geschmackseindruck beiträgt (DeSimone *et al.*, 2001; Lyall *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2008; Sturz *et al.*, 2011).

Der Geschmacksmodalität bitter wird die Wahrnehmung von Toxinen zugeschrieben. Eine Vielzahl an chemischen Verbindungen unterschiedlichster Struktur, unter anderem Aminosäuren, Peptide, Amine, Amide, N-heterozyklische Verbindungen, Ester, Lactone, Harnstoffverbindungen, Phenole, Polyphenole, Terpene, Glycoside, Alkaloide, Fettsäuren und Metallsalze (Barratt-Fornell *et al.*, 2002; Meyerhof, 2005), vereint die Eigenschaft des Bittergeschmacks. Die meisten sind pflanzlichen Ursprungs, wo sie der Abwehr von Herbivoren und Pathogenen dienen (Biere *et al.*, 2004). Andere Bitterstoffe werden im Zuge der Prozessierung wie Erhitzen oder Fermentierung gebildet oder entstehen beim Altern von

Lebensmitteln wie dem Ranzigwerden von Fett durch Oxidation (Belitz & Wieser, 1985). Während ein milder Bittergeschmack in Lebensmitteln und Getränken (bspw. Schokolade, Kaffee, Tee, Bier; Stein *et al.*, 2003) auch als genussvoll empfunden werden kann, wird ein intensiver Bittergeschmack zumeist abgelehnt. Bei Konsum von stark bitteren Substanzen kommt es zu aversivem Verhalten und Abwehrreaktionen wie Würgreflexen bis hin zu Erbrechen. Die Fähigkeit der Wahrnehmung und Diskriminierung süßer und bitterer Nahrungsquellen ist bereits von Geburt an entwickelt (Steiner *et al.*, 2001). Neugeborene zeigen daher die gleichen mimischen Lust- und Unlustreaktionen auf Geschmacksstoffe wie Erwachsene (gustofazialer Reflex). Erfahrungen und soziale Prägungen führen jedoch im Laufe des Lebens zu individuellen Präferenzen und Aversionen gegenüber bestimmten Nahrungsmitteln (Stroebele & De Castro, 2004). Weiterhin ist die Sensibilität für die Wahrnehmung von Substanzen genetisch beeinflusst und unterliegt individuellen Unterschieden (Reed *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003; Garcia-Bailo *et al.*, 2009).

1.1 Anatomie des Geschmackssinns

Die Wahrnehmung von Geschmackseindrücken erfolgt über Geschmacksknospen, die in Mund- und Rachenraum angeordnet sind. Diese sind primär im Zungenepithel lokalisiert und in drei Geschmackspapillenarten – den Wall-, Blätter-, und Pilzpapillen – angesiedelt. Die Wallpapillen (*Papillae vallatae*) sind im hinteren Zungenabschnitt an der Grenze zum Zungengrund angeordnet und variieren in ihrer Anzahl beim Menschen zwischen vier und 18 Papillen (Witt *et al.*, 2003). Die Maus hingegen weist nur eine einzelne, zentral gelegene Wallpapille auf. Folglich variieren die Geschmacksknospen der Wallpapille(n) je nach Spezies zwischen mehreren hundert bis tausend (Jung *et al.*, 2004; Hoon *et al.*, 1999). Die Blätterpapillen (*Papillae foliatae*), die in den hinteren zwei Dritteln der Zunge zu beiden Seiten angeordnet sind, setzen sich aus zwei bis neun Papillen zusammen. Diese können beim Menschen mehrere hundert und bei der Maus mehrere Dutzend Geschmacksknospen beherbergen (Hoon *et al.*, 1999). Pilzpapillen (*Papillae fungiformes*) stellen die zahlenmäßig größte Papillengruppe dar und erstrecken sich hinsichtlich ihrer Lokalisation vorrangig über die vorderen zwei Drittel der Zunge. In Abhängigkeit der Lokalisation wurden für den Mensch durchschnittlich 2,6 bis 3,4 Geschmacksknospen pro Pilzpapille beobachtet (Miller, 1995). In Nagetieren besteht die Pilzpapille zumeist nur aus einer, in sehr seltenen Fällen aus zwei Geschmacksknospen (Krimm & Hill, 1998; Beidler & Smallman, 1965; Hoon *et al.*, 1999). Darüber hinaus befinden sich unzählige Fadenpapillen (*Papillae filiformes*) auf dem Zungenrücken. Sie enthalten jedoch keine Geschmacksknospen, sondern sind wahrscheinlich an der Beurteilung mechanischer und taktiler Eigenschaften von Lebensmitteln beteiligt (Jung *et al.*, 2004). Abb. 1.1 zeigt schematisch die Lokalisation der Papillenarten in der Mundhöhle.

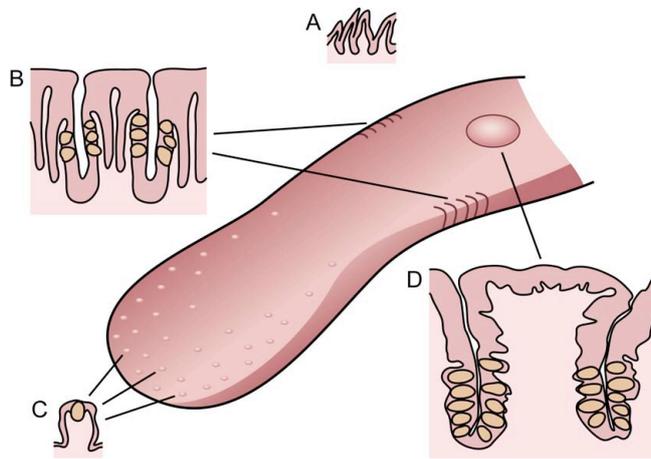


Abb. 1.1. Schematische Darstellung der Geschmackspapillen der Maus. Im Zungenepithel der Maus befinden sich vier Arten von Papillen (A-D), unter ihnen drei Geschmackspapillen (B-D). (A) Fadenpapillen, (B) Blätterpapillen, (C) Pilzpapillen, (D) Wallpapille. (Bild: Jonas Töle)

Weiterhin konnten Geschmacksknospen im weichen Gaumen (*Palatum*), im Geschmacksstreifen, in den Schleimhäuten des Kehlkopfes (*Larynx*), des Rachen-Bereiches (*Pharynx*) und im cranialen Abschnitt der Speiseröhre (*Ösophagus*) nachgewiesen werden (Kaplick, 1953; Lalonde & Eglitis, 1961; Miller & Smith, 1984; Miller & Spangler, 1982). In Nagetieren wurde zusätzlich im sogenannten *Ductus incisivus* (engl. *naso-incisior duct*, NID) über die Existenz von Geschmacksknospen berichtet. Der NID wird aus bilateral gelegenen Gängen gebildet, die die Mundhöhle mit der Nasenhöhle verbinden und sich topographisch zwischen den Schneidezähnen und dem harten Gaumen in der Mundhöhle befinden (Ohtayamakita *et al.*, 1982; Miller & Smith, 1984; Miller & Spangler, 1982). Die Gänge münden auf Seite des Gaumens in die *Papilla incisiva*.

Die Auszählung von Geschmacksknospen in Nagern zeigte, dass etwa 25 % der Geschmacksknospen in der Zungenspitze, zirka 50 % im posterioren Abschnitt der Zunge sowie etwa 12 % der Geschmacksknospen im weichen Gaumen lokalisiert sind (Miller & Smith, 1984).

Geschmacksknospen setzen sich je nach Spezies aus 50 bis 150 Epithelzellen zusammen (Lindemann, 1996). Basierend auf morphologischen Kriterien wie Elektronendichte, Form des Zellkerns, der Gesamtzelle und der apikalen Strukturen (Mikrovilli) wurden in den 80er Jahren vier verschiedene Zelltypen (Typ I bis IV) in den Geschmacksknospen identifiziert. Den elektronenmikroskopischen Beobachtungen konnten im vergangenen Jahrzehnt im Zuge der Zelltyp-Charakterisierung histochemische und funktionelle Eigenschaften zugeordnet werden.

Typ-I-Zellen sind der am häufigsten in der Geschmacksknospe vorliegende Zelltyp (50 % bis 60 %; Kinnamon *et al.*, 1985, 1988; Delay *et al.*, 1986). Sie zeichnen sich durch ein elektronenmikroskopisch dunkles Cytoplasma aus, auf Grund dessen sie auch als „dunkle Zellen“ bezeichnet werden (Kinnamon *et al.*, 1985; Delay *et al.*, 1986; Nelson & Finger, 1993). Mit ihren verlängerten cytoplasmatischen Lamellen sind sie in der Lage, sich um benachbarte Zellen zu legen (Pumplin *et al.*, 1997), weshalb ihm eine Glia-ähnliche Funktion zugeschrieben wird. Typ-I-Zellen exprimieren unter anderem den Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST), was Lawton und Kollegen/innen eine Involvierung der Typ-I-Zellen in die Aufnahme von Glutamat mutmaßen ließ (Lawton *et al.*, 2000). Weiterhin exprimieren die Zellen NTPDase 2 (*nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2*), eine Plasmamembran-gebundene Nukleotidase, welche extrazelluläres ATP hydrolysiert (Bartel *et al.*, 2006). Die Expression von GLAST und

NTPDase 2 lässt vermuten, dass Typ-I-Zellen die Ausbreitung von Neurotransmittern durch Aufnahme und Abbau dieser unterbinden bzw. zumindest reduzieren. Kürzlich konnte Dvoryanchikov zeigen, dass Typ-I-Zellen den Kaliumkanal ROMK (*renal outer medullary potassium*), welcher möglicherweise in der Kalium-(K⁺)-Homöostase der Geschmacksknospe involviert ist, exprimieren (Dvoryanchikov *et al.*, 2009). Immunhistochemische Untersuchungen legen weiterhin nahe, dass Typ-I-Zellen an der Wahrnehmung von Fettsäuren beteiligt sein könnten. 2010 gelang es der Arbeitsgruppe um Ninomiya und Damak eine Kolo-kalisation des G-Protein-Rezeptors 40 (GPR40), für den *in vitro* und *in vivo* eine Aktivierung durch mittel- und langkettige Fettsäuren gezeigt werden konnte (Briscoe *et al.*, 2003; Cartoni *et al.*, 2010), mit einem Typ-I-Zellmarker aufzuzeigen (Cartoni *et al.*, 2010). Ferner weisen Typ-I-Zellen eine Amilorid-Sensitivität auf, was eine Beteiligung dieses Zelltyps an der Wahrnehmung des Salzgeschmack vermuten lässt (Vandenbeuch *et al.*, 2008).

Die Typ-II-Zellen stellen etwa 25 % der Zellen in der Geschmacksknospe (Delay *et al.*, 1986). Sie sind durch ein weniger elektronendichtes Erscheinungsbild („helle Zellen“) sowie morphologisch durch eine längliche Zellform mit großem, rundem Zellkern gekennzeichnet (Kinnamon *et al.*, 1985; Delay *et al.*, 1986). An ihrer apikalen Seite weisen die Zellen zahlreiche, gleichlange Mikrovilli auf. In der Zellmembran dieser Mikrovilli befinden sich Rezeptoren, die für die Bindung von Geschmacksstoffen der Qualitäten umami, süß oder bitter verantwortlich sind (Hoon *et al.*, 1999; Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Matsunami *et al.*, 2000; Miyoshi *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001, 2002; Li *et al.*, 2002). Daher werden sie auch als Geschmacksrezeptorzellen bezeichnet. Weiterhin exprimieren die Typ-II-Zellen GPR40 und GPR120, die an der Wahrnehmung von Fettsäuren beteiligt sind (Matsumura *et al.*, 2007, 2009; Cartoni *et al.*, 2010). Ferner konnte die Expression von Proteinen, die in der Vermittlung der Geschmackssignalkaskaden von umami, süß und bitter involviert sind, wie die G-Proteinuntereinheit α -Gustducin (Boughter Jr. *et al.*, 1997), die Phospholipase C β 2 (PLC β 2; Miyoshi *et al.*, 2001; Clapp *et al.*, 2004), den Inositoltrisphosphat-Rezeptor 3 (IP $_3$ R3; Clapp *et al.*, 2001; Miyoshi *et al.*, 2001) und den Kationenkanal TrpM5 (*transient receptor potential cation channel subfamily M member 5*; Perez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003) gezeigt werden. Eine Aktivierung der Typ-II-Zellen durch saure oder salzige Stimuli scheint jedoch nicht zu erfolgen (Tomchik *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2009). Typ-II-Zellen besitzen dabei weder Synapsen noch die entsprechende präsynaptische Maschinerie, die mit Synapsen assoziiert sind (Romanov *et al.*, 2007; DeFazio *et al.*, 2006; Clapp *et al.*, 2006). Stattdessen exprimieren Typ-II-Zellen zur Generierung und Weiterleitung von Aktionspotentialen spannungsabhängige Na⁺- und K⁺-Kanäle (Medler *et al.*, 2003) bzw. Pannexin-Hemikanäle, über die die Freisetzung des Neurotransmitters ATP erfolgt (Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007, Dando & Roper, 2009; Murata *et al.*, 2010).

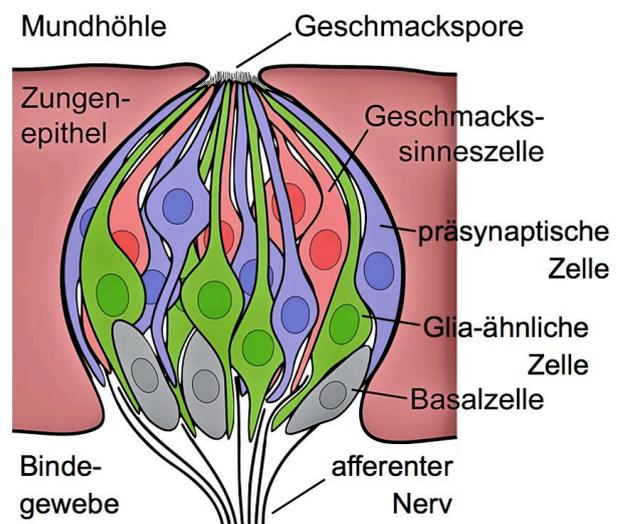
Die Typ-III-Zellen, die einen Anteil von 15 % an allen Geschmacksknospenzellen ausmachen (Delay *et al.*, 1986), zeichnen sich durch eine langgestreckte, schmale Zellform, einen ovalen Zellkern und einen einzelnen, dicken Mikrovillus aus. Die elektronenmikroskopische Erscheinung ist weniger elektronendicht als die von Typ-I-Zellen, daher werden sie auch als „intermediäre Zellen“ bezeichnet. Typ-III-Zellen exprimieren Proteine, die mit der Bildung von Synapsen assoziiert sind, wie das Synaptosom assoziierte Protein 25 (SNAP 25; Yang *et al.*,

2000) und Synaptobrevin sowie die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase (*L-aromatic acid decarboxylase*; AADC; DeFazio *et al.*, 2006), das Zelladhäsionsmolekül NCAM (*neural cell adhesion molecule*; Nelson & Finger, 1993; Takeda *et al.*, 1992) und spannungsabhängige Ca²⁺- (Calcium-), Na⁺- und K⁺-Kanäle zur Generierung von Aktionspotentialen (Medler *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2009; Clapp *et al.*, 2006). Typ-III-Zellen, auch präsynaptische Zellen genannt, sind an der Vermittlung der Geschmacksqualität sauer beteiligt (Huang *et al.*, 2006, 2008). Auch werden sie in intakten Geschmacksknospen (im Zellverband) zeitlich geringfügig verzögert durch Signalmoleküle der Typ-II-Zellen (ATP) stimuliert (Tomchik *et al.*, 2007; Roper, 2009). Eine isolierte Typ-III-Zelle unterliegt jedoch keiner Aktivierung durch Stoffe der Geschmacksqualitäten umami, süß und bitter.

Typ-IV-Zellen – zumeist kugelige bis eiförmige Zellen – werden als Basalzellen verstanden, die sich an der Basis von Geschmacksknospen befinden. Einer der wenigen bekannten Zellmarker für diesen, etwa 10 % an der Geschmacksknospe ausmachenden Zelltyp (Delay *et al.*, 1986), ist *Sonic hedgehog* (Shh; Miura *et al.*, 2001). Lange war nicht hinreichend geklärt, ob Typ-IV-Zellen undifferenzierte Geschmacksknospenzellen darstellen, aus denen die Zelltypen I bis III hervorgehen oder nicht (Delay *et al.*, 1986; Pumplin *et al.*, 1997). Neueste Untersuchungen lassen jedoch vermuten, dass ausgehend von Typ-IV-Zellen eine binäre Differenzierung in umami-, Süß- oder Bittergeschmacksrezeptorzellen bzw. Sauer-Zellen (Typ-III-Zellen) erfolgt (Matsumoto *et al.*, 2011)

Die Geschmacksknospenzellen formen am apikalen Ende eine Geschmackspore, durch die Speichel und gelöste Geschmacksstoffe an die Sinneszellen gelangen. In diese Geschmackspore ragen die Mikrovilli der Typ-II-Zellen, welche für die Reizaufnahme verantwortliche Geschmacksrezeptoren enthalten. Das Eindringen von Wasser und gelösten Geschmacksstoffen in den intrazellulären Raum der Geschmacksknospe wird über sogenannte *tight junctions* verhindert, die die apikalen Regionen der Geschmacksknospenzellen miteinander verbinden (Murray, 1993). Der schematische Aufbau einer Geschmacksknospe kann der Abb. 1.2 entnommen werden.

Abb. 1.2. Schematische Darstellung einer Geschmacksknospe. Eine Geschmacksknospe setzt sich aus 50 bis 150 Epithelzellen zusammen, die vier verschiedenen Zelltypen zugeordnet werden können (Zelltyp I bis IV). Die Epithelzellen formen auf der apikalen Seite der Geschmacksknospe eine Geschmackspore, in denen Rezeptorproteine, die in die Mikrovilli von Geschmackssinneszellen eingelassen sind, direkt in Verbindung mit Geschmacksstimuli treten können. Afferente Nervenfasern, die die Geschmacksknospe innervieren, tragen diese Geschmacksinformationen zum zentralen Nervensystem. (Bild: Jonas Töle)



In den letzten Jahren wurden zunehmend Geschmacksrezeptoren auch in nicht-gustatorischen Geweben wie dem Nasenepithel (Finger *et al.*, 2003; Tizzano *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 1996), der glatten Muskulatur der Atemwege (Deshpane *et al.*, 2010), im Gastrointestinaltrakt (Bezencon *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2002, 2005; Rozengurt, 2006; Cumming & Overduin, 2007; Rozengurt & Sternini, 2007; Dyer *et al.*, 2005), im Pankreas (Nakagawa *et al.*, 2009; Taniguchi, 2004), in Leber (Taniguchi, 2004), in Niere (Kiuchi *et al.*, 2006), im Thymus (Max *et al.*, 2001), in Lymphozyten (Kiuchi *et al.*, 2006) und Hoden (Iwatsuki *et al.*, 2010, Thomas *et al.*, 1996; Kitagawa *et al.*, 2001; Kiuchi *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2001; Matsunami *et al.*, 2000) nachgewiesen. Neueste Publikationen zeigen weiterhin eine Expression von Geschmacksrezeptoren im Gehirn (Shin *et al.*, 2010, Singh *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2009).

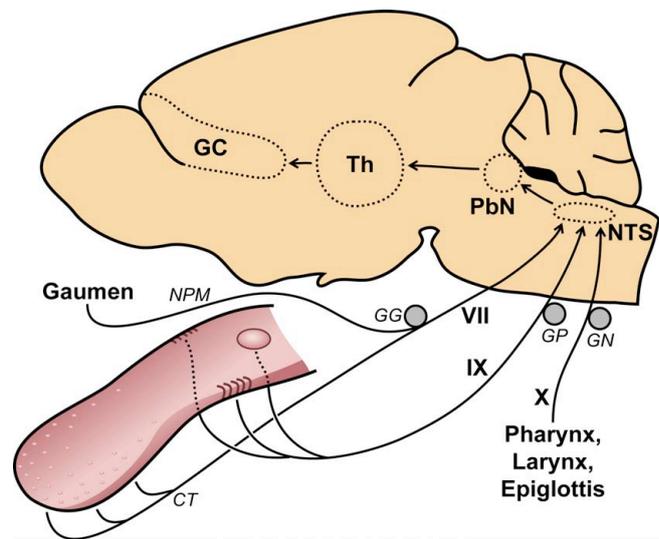
1.2 Neuronale Kodierung der Geschmacksinformationen

1.2.1 Projektionsgebiete von Geschmacksinformationen

Geschmackssinneszellen sind sekundäre Sinneszellen, das heißt, sie selber haben keine Nervenfortsätze. Sie werden in Abhängigkeit von ihrer Lage auf der Zunge und im Mund-Rachen-Raum von drei afferenten Hirnnervenfasern (VII, IX, X) innerviert. Der *Chorda-tympani*-Zweig des *Nervus facialis* (VII. Hirnnerv) versorgt die Pilzpapillen und die anterior gelegenen Blätterpapillen (Whiteside, 1927). Die Geschmacksknospen des Gaumens inklusive des NIDs werden ebenfalls durch einen Ast des VII. Hirnnervs innerviert, dem *Nervus petrosus major* (Miller & Spangler, 1982). Die Zellkörper der Ausläufer des VII. Hirnnervs sind im *Ganglion geniculatum* lokalisiert. Der *Nervus glossopharyngeus* (IX. Hirnnerv) innerviert die Wall- und den größeren Anteil der Blätterpapillen (Whiteside, 1927; Guth, 1957). Die Zellkörper dieses Nervs befinden sich im *Ganglion petrosum*. Die Geschmacksknospen der Epiglottis und des Larynx- und Pharynxbereiches werden durch Fasern des *Nervus vagus* (*Nervus laryngeus superior*; *Zweig des X. Hirnnervs*; Belecky & Smith, 1990) innerviert, dessen Zellkörper im *Ganglion nodosum* liegen. Die Verarbeitung der Geschmacksinformation von der Mundhöhle zum Gehirn ist in Abb. 1.3 skizziert.

Abb. 1.3. Schematische Darstellung der Projektionsgebiete von Geschmacksinformationen in der Maus.

Die Geschmacksknospen der Maus werden durch die Äste dreier Nerven (VII, IX, X) innerviert. Der VII. Hirnnerv (Nervus facialis) innerviert über den Ast der Chorda tympani (CT) und des Nervus petrosus major (NPM) die Pilzpapillen bzw. die Papilla incisiva und den Gaumen. Die Zellkörper dieser Nerven sind im Ganglion geniculi (GG) lokalisiert. Die Blätterpapillen und die Wallpapille werden von Fasern des IX. Hirnnervs (Nervus glossopharyngeus) versorgt, dessen Zellkörper im Ganglion petrosum (GP) gelegen sind. Die Innervation der Geschmacksknospen im Rachen- und Kehlkopfbereich erfolgt über den Nervus vagus (X. Hirnnerv). Die Zellkörper dieses Nervs befinden sich im Ganglion nodosum (GN). Ausgehend von der Zunge erfolgt die Projektion der Geschmacksinformationen über die drei Hirnnerven zum Nucleus tractus solitarius (NTS). Von hier werden die gustatorischen Informationen im Wesentlichen über den Nucleus parabrachialis (PbN) zum Thalamus (Th) und weiter zum gustatorischen Cortex (GC) projiziert. (Bild: Jonas Töle)



Die Hirnnerven leiten die Informationen weiter zum rostralen Bereich des *Nucleus tractus solitarius* (NTS) der *Medulla oblongata* (Hamilton & Norgren, 1984). Dabei werden die Fasern des *Nervus facialis* am weitesten rostral verschaltet, weiter caudal gefolgt von Fasern des *Nervus glossopharyngeus*. Am weitesten caudal befindet sich das Projektionsgebiet des *Nervus vagus*. Die einzelnen Projektionsgebiete im rostralen NTS zeigen dabei starke Überlappungen (Hamilton & Norgren, 1984). Vom NTS wird die Geschmacksinformation beim Menschen auf Neurone gustatorischer Kerngebiete höherer Ordnung übertragen und zusammen mit Informationen von Schmerz, Temperatur und Berührung in den Relais-Kernen (*Nucleus ventralis posteromedialis*) des ventralen Thalamus eingespeist (Pritchard, 1991). Von hier erfolgt die Projektion in den primären gustatorischen Cortex, der im *Operculum frontale* liegt. Ein anderer Teil der Fasern projiziert über absteigende Projektionsbahnen die Information unter Umgehung des Thalamus zu Hypothalamus, Amygdala und *Stria terminalis*. Jene Projektionsgebiete sind für emotionale Komponenten der Geschmacksempfindung sowie dem Belohnungs- und Suchtverhalten von Bedeutung (Smith & Boughter, 2007). Bei Nagetieren erfolgt die Projektion der gustatorischen Information vom NTS über den *Nucleus parabrachialis* (PbN; Norgren, 1978; Travers, 1988) im Pons des Metencephalon. Vom PbN projizieren die Neurone hier über den Thalamus in den granulären Inselcortex (*Cortex insularis*), dem primären gustatorischen Cortex bei Nagern (Sewards & Sewards, 2001, Rolls, 1995). Weiterhin erfolgt eine aufsteigende Projektion zum Hypothalamus, zur Amygdala und zu Neuronen des *Nucleus interstitialis striae terminalis* (Norgren, 1974, 1976, 1978), ebenso wie eine Weiterleitung zum sekundären gustatorischen Cortex (caudo-lateraler orbitofrontaler Cortex; Rolls, 1995, 2004). Feedbackmechanismen von Arealen des Tel- und Diencephalon zu gustatorischen Neuronen der *Medulla oblongata* wiederum ermöglichen eine gezielte Steuerung der Nahrungsaufnahme (van der Kooy *et al.*, 1984; Allen *et al.*, 1991).

Ungeachtet der Aufklärung wesentlicher gustatorischer Projektionsgebiete im Gehirn und einzelner Kerngebiete bleibt die Frage, wie diese Geschmacksinformationen im Detail verarbeitet und vermittelt werden, bisher unbeantwortet.

1.2.2 Kodierung von Geschmacksinformationen

Viele zentrale Neuronen reagieren neben Reizen wie Temperatur und taktilen Stimuli zumeist auf mehrere Geschmacksstimuli unterschiedlicher Qualität (*broadly tuned*) als periphere Neuronen (Travers, 1993; Smith & Scott, 2003). Dies ist zum einen der Konvergenz von Informationen geschuldet. So erreichen den NTS Aktionspotentiale, die ihren Ursprung in verschiedenen gustatorischen Arealen genommen haben und teilweise für unterschiedliche Qualitäten kodieren. Folglich ist das Aktivierungsspektrum im NTS größer als das von Neuronen, die der Geschmacksrezeptorzelle nachgeschaltet (Ganglienzellen) sind (Travers *et al.*, 1986; Travers & Norgren, 1991). Dennoch vermittelt jedes Neuron vorrangig eine Geschmacksqualität am besten (Frank, 1973; Smith & John, 1999). Dabei ist ungeklärt, ob die Gesamtheit des Erregungsmusters die Geschmacksinformation kodiert oder ob nur die stärkste Antwort eines jeden Nervs für die Vermittlung einer Qualität relevant ist und schwächere Nervenantworten als Hintergrundrauschen einzustufen sind (Smith *et al.*, 2000). Dies führte zur Formulierung zweier unterschiedlicher Theorien wie Geschmacksinformationen kodiert werden. Die *across-fiber-pattern*-Theorie (oder Neuronenmustertheorie) von Carl Pfaffmann basiert auf der Annahme, dass alle Neurone und deren Erregungsmuster zur Kodierung der Geschmacksinformationen beitragen, unabhängig davon, ob Neurone aktiviert werden oder nicht (Pfaffmann, 1941). Die *labeled-line*-Theorie (oder Einzelneuronentheorie) geht hingegen von der Grundannahme aus, dass Neurone durch nur eine Geschmacksqualität aktiviert werden und daher spezifische Neuronenpopulationen für diese bestimmte Qualität zuständig sind. Folglich agieren die geschmacksspezifischen Neuronenbahnen entsprechend diesem Modell unabhängig voneinander und vermitteln die Geschmacksinformationen über Nervenbahnen an die gustatorischen Hirnareale, die nicht durch andere Geschmacksmodalitäten erregt werden können (Pfaffmann, 1974). In den letzten Jahrzehnten wurden Belege für beide Theorie gefunden.

1.2.2.1 Kodierung von Geschmacksinformationen in der Peripherie

Die Geschmackswahrnehmung beginnt in der Peripherie durch das Wechselspiel von einem Geschmacksstoff mit seinem spezifischen Rezeptor. Expressionsstudien in den letzten zehn Jahren haben gezeigt, dass separate Zellpopulationen in der Geschmacksknospe für die Wahrnehmung von verschiedenen Geschmacksqualitäten verantwortlich sind (Nelson *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2003; Chandrashekar *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Chandrashekar *et al.*, 2010). So gilt es als sicher, dass TAS1- und TAS2-Rezeptoren in Geschmacksrezeptorzellen nicht koexprimiert werden. Weiterhin konnte nur in 10 % der Fälle eine Expression der Rezeptoren, die an der Vermittlung der Geschmacksmodalitäten umami und süß verantwortlich sind, gezeigt werden (Stone *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse bestärkten die Hypothese, dass jede Geschmackszelle eine Geschmacksqualität vermittelt. Analysen mit

gentechnisch veränderten Mäusen unterstützen diese Annahme. So führte die Expression eines modifizierten κ -Opioid-Rezeptors (RASSL; *receptor activated solely by a synthetic ligand*) in Geschmacksrezeptorzellen, die natürlicherweise Tas1r2-Rezeptoren exprimieren, zu Mäusen, die eine konzentrationsabhängige Attraktivität für den synthetischen, geschmacksneutralen κ -Opioid-Rezeptoragonisten Spiralodin aufzeigten (Zhao *et al.*, 2003). Umgekehrt führte die Gabe von Spiralodin in Mäusen, die den κ -Opioid-Rezeptor in einer Bitterrezeptorzelle (Tas2r119) exprimierten, zu einem konzentrationsabhängigen, aversiven Verhalten der Maus (Mueller *et al.*, 2005). Ein ähnliches Resultat konnte beobachtet werden, als ein humaner Bitterrezeptor (TAS2R16) in Tas1r2-Rezeptor exprimierende Zellen der Maus eingebracht wurde. Die Mäuse zeigten eine Vorliebe für den Bitterstoff Phenyl- β -D-glucopyranosid, den sie von Natur aus nicht schmecken und der Ligand des eingebrachten Bitterrezeptors ist (Mueller *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass Mäuse eine Präferenz für Opiate oder Bitterstoffe aufzeigen, wenn die an der Vermittlung beteiligten Rezeptoren in einer ursprünglich Tas1r2-exprimierenden Zellen zu finden sind, spricht für festprogrammierte (*hardwired*) Geschmacksrezeptorzellen. Folglich muss die Stimulation einer Süßrezeptorzelle immer – unabhängig vom auslösenden Stimulus – zur Generierung eines Aktivierungsmusters im zentralen Nervensystem führen, welches bei einem Süßstimulus erzeugt wird. Diese Experimente wurden zumeist als Indiz für die Kodierung von Geschmacksinformationen nach der *labeled-line*-Theorie verstanden, allerdings sagen jene Analysen bei genauerer Betrachtung nichts über die Art der Fortleitung der gustatorischen Information aus.

Im Vergleich zu Geschmacksrezeptorzellen, deren Aktivierung auf ein kleines Ligandenspektrum beschränkt zu sein scheint, werden präsynaptische Zellen im Zellverband einerseits direkt durch saure, als auch durch aktivierte, ATP-sekretierende Geschmacksrezeptorzellen stimuliert (Huang *et al.*, 2008, 2009). Folglich besitzen präsynaptische Zellen ein wesentlich umfangreicheres Erregungsspektrum als Geschmacksrezeptorzellen. Inwieweit dieses für die Kodierung von Geschmacksqualität und -intensität von Belang ist, ist jedoch unklar.

1.2.2.2 Kodierung von Geschmacksinformationen im zentralen Nervensystem

Ähnlich den präsynaptischen Zellen weisen alle nachgeschalteten Neurone in den verschiedenen gustatorischen Arealen des zentralen Nervensystems (NTS, PbN) ein breites Aktivierungsspektrum auf. Um das Erregungsmuster verschiedener Neurone vergleichen zu können, führten Smith und Travers den *breadth of tuning* (H-Wert) ein (Smith & Travers, 1979). Dieser beschreibt das Erregungsspektrum von Neuronen und kann einen Wert zwischen Null und eins annehmen. Ein H-Wert von 0,0 heißt, dass Neurone ausschließlich auf eine Geschmacksqualität reagieren. Ein H-Wert von eins würde eine gleichmäßige Aktivierbarkeit des Neurons durch fünf Geschmacksqualitäten anzeigen. Grundvoraussetzung für die Vergleichbarkeit sind konstante Stimuluskonzentrationen. Erste Vergleiche dieser Art wurden in den 70er- und 80er-Jahren am *Chorda-tympani*-Nerv sowie Neuronen des NTS und PbN des Hamsters durchgeführt (Frank, 1973; Travers & Smith, 1979; Van Buskirk & Smith, 1981).

Ein Vergleich der H-Werte zeigte, dass im Mittel der H-Wert von der Peripherie (*Chorda-tympani*-Nerv, $H = 0,56$) zum Hirnstamm (NST, $H = 0,66$; PbN, $H = 0,65$) zunahm. So zeigten Neurone, die am besten auf Süßstimuli ansprachen (*S-Best*), eine Zunahme des H-Wertes vom *Chorda-tympani*-Nervs ($0,39$), über den NTS ($0,59$) bis hin zum PbN ($0,74$). Für Neurone, die am besten durch Bitterstimuli reagierten (*B-Best*), konnte hingegen in mehreren Studien kein signifikanter Anstieg des H-Wertes vom NTS zum PbN beobachtet werden (Smith *et al.*, 1983; Frank *et al.*, 1988; Smith & Scott, 2003; Geran & Travers, 2006, 2009). Auch konnte kein weiterer Anstieg des H-Wertes zwischen *Medulla oblongata* und Cortex festgestellt werden. Vielmehr wurde für Neuronen ein engeres Aktivierungsspektrum im Thalamus und Cortex im Vergleich zum NTS erfasst (Rolls, 1995; Scott & Giza, 2000).

Ein weiteres Untersuchungsobjekt im Zuge neurologischer Experimente in den vergangenen Jahren war Amilorid – ein Wirkstoff, der den Einstrom von Na^+ -Ionen über ENaC in die Zelle blockiert und den Na^+ -spezifischen Salzgeschmack bei Nagern und Hamstern inhibiert (Frank *et al.*, 1983; Kretz *et al.*, 1999). Nervenableitungen bei Hamstern zeigten, dass Amilorid nicht nur die Antworten von Neuronen, die am besten auf Salzstimuli reagierten (*N-Best*), reduzierte, sondern auch die Salzantwort von Neuronen, die am besten auf Süßstimuli reagierten (*S-Best*), stark beeinträchtigte (Boughter Jr. & Smith, 1998; Smith *et al.*, 1996). Im Zuge jener Experimente konnte ebenfalls verdeutlicht werden, dass die Salze Kaliumchlorid (KCl) und Natriumchlorid (NaCl), die von Hamstern unterschieden werden können (Boughter Jr. *et al.*, 1999), mit ansteigender Konzentration in immer ähnlichere Aktivierungsmuster der *N-Best*-Neuronen münden. Eine Unterscheidung der Salze entsprechend der alleinigen Aktivität der *N-Best*-Neurone scheint folglich nicht möglich. Werden jedoch Neurone, die nicht am besten auf Salzstimuli reagieren, in die Betrachtung mit eingeschlossen (insbesondere Neurone, die am besten auf Säuren reagieren – *H-Best*), ist eine Diskriminierung zwischen den Salzen – wie sie für Hamster nachgewiesen werden konnte – auf Neuronenebene möglich.

Neben der Kodierung der Geschmacksinformation über spezifische Nervenbahnen und ihrer unterschiedlichen Aktivierbarkeit scheint auch das zeitliche Arrangement der Aktivierung zur Verschlüsselung der Informationen beizutragen (Di Lorenzo *et al.*, 2009; Hallock & Di Lorenzo, 2006). So konnten zeitliche Unterschiede in Bezug auf die maximale Feuerrate und variierende Konzentrationseffekte auf die Anstiegszeit bei der Stimulation von Ratten mit NaCl, Salzsäure (HCl), Chinin oder Saccharose festgemacht werden (Harada *et al.*, 1983). Eine eindeutige, präzise Ableitung der Geschmacksqualität ausgehend vom temporalen Muster konnte jedoch nicht belegt werden (Nagai & Ueda, 1981).

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ähnliche Geschmacksstoffe in Bezug auf ihre Amplitude zu deutlich vergleichbareren, neuronalen Aktivitäten führen als Stoffe unterschiedlicher Geschmacksqualität. Dies lässt vermuten, dass die zeitliche Kodierung für die Chiffrierung ähnlicher Geschmacksstoffe relevant sein könnte (Roussin *et al.*, 2008).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass gustatorische Informationen über topographische Aktivierungsmuster kodiert werden. Einzelne Studien zeigten, dass Stimulationen mit Saccharose überwiegend Neurone im mediolateralen NTS aktivierten, während der Bitterstimulus Chinin fast ausschließlich Neuronen im medialen NTS stimulierte (DiNardo &

Travers, 1997; Travers, 2002; Travers *et al.*, 2007). Der Einsatz der Magnetresonanztomographie (MRT) beim Menschen zeigte die Aktivierung unterschiedlicher Hirnareale mit teilweisen Überlappungen im primären gustatorischen Cortex für alle Geschmacksqualitäten (Schoenfeld *et al.*, 2004). Bitterstimuli schienen dabei in mehr lateral gelegene Bereiche des gustatorischen Cortex – mit größerer Distanz von Hirnregionen, die durch attraktive Stimuli angesprochen werden – gelegen zu sein. Von einem eindeutigen Nachweis für eine chemo-topographische Organisation des primären gustatorischen Cortex sprechen Schoenfeld und Mitarbeiter/innen aber nicht, da die extreme Faltung des Cortex, eine hohe individuelle Variabilität und die Bewegung der Probanden (Schluckbewegungen) die Messgenauigkeit limitierten.

1.2.2.3 Kodierung von geschmacksstoffbegleitenden Informationen

Erschwert werden präzise Aussagen über die Weiterleitung gustatorischer Informationen auch durch sogenannte geschmacksstoffassoziierte Stimuli. So beruhen neuronale Aktivierungen gustatorischer Neurone nicht ausschließlich auf Geschmacksstimuli (Qualität und Intensität), sondern auch auf mechanischen Stimuli, Lösungsmittel (Wasser), Temperatur, Viskosität und Osmolarität (Todorok & Bartoshuk, 1991; Accolla *et al.*, 2007; de Araujo *et al.*, 2003; Cruz & Green, 2000; Verhagen *et al.*, 2004; Rolls, 2010). Beispielsweise vermittelt ein großer Teil gustatorischer Neurone im NTS neben Geschmacksinformationen auch Antworten taktiler Rezeptoren (Travers & Norgreen, 1995; Travers, 1993; Breza *et al.*, 2006). Im PbN und Thalamus konnte durchschnittlich eine Konvergenz von gustatorischen und mechanischen Stimuli von 77 % bzw. 88 % erfasst werden (Travers, 1993). Neben der mechanischen Sensitivität zeigen zahlreiche gustatorischen Neurone eine Sensitivität gegenüber Temperatur (Ogawa *et al.*, 1988; Lundy & Contreras, 1999; Yamashita & Sato, 1965; Sato, 1967). Ogawa und Mitarbeiter/innen beschrieben bereits 1968 in Ratten und Hamstern eine thermale Stimulation des *Chorda-tympani*-Nervs (Ogawa *et al.*, 1968). Diese Sensitivität für Wärme und Kälte konnte weiterhin auch für zentrale gustatorische Neurone im NTS (Ogawa *et al.*, 1988), PbN (Travers & Smith, 1984), im Thalamus (Verhagen *et al.*, 2003) und im Cortex (Yamamoto *et al.*, 1981) belegt werden. Weiterhin wurde schon früh berichtet, dass die Erwärmung und Kühlung kleiner, anteriorer Zungenareale mit Geschmackseindrücken wie süß bzw. salzig oder sauer einhergeht (Cruz & Green, 2000). Auch bedingt die Temperatur einer Geschmackslösung unterschiedliche Geschmacksintensitäten bei gleich konzentrierten Geschmackslösungen. Während 25°C warme Na⁺- und Ammoniumsalzlösungen signifikant geringe Nervenantworten herbeiführen als 35°C warme Salzlösungen (Lundy & Contreras, 1997), wurden für verschiedene Bitterstoffe sowohl Steigerungen als auch Minderungen für Schwellenwerte mit zunehmender Temperatur festgestellt (Talavera *et al.*, 2007). Demgegenüber wird die Geschmacksmodalität süß stets weniger intensiv wahrgenommen, wenn die Temperatur reduziert wird (Bartoshuk *et al.*, 1982). An TrpM5-*Knockout*-Tieren konnte demonstriert werden, dass die beobachtete Temperatursensitivität für Süßstimuli auf die Wärmeaktivierung des Ionenkanals zurückzuführen ist (Talavera *et al.*, 2005). Die Temperatur der Zunge scheint dabei im Vergleich zur Temperatur der Geschmackslösung den größeren Einfluss zu haben (Green & Frankmann, 1987, 1988). Das Lösungsmittel von Geschmacksstoffen ist zumeist Wasser.

Wasser selbst jedoch bewirkt bereits eine Aktivierung von Neuronen im NTS, PbN und Cortex (Gilbertson *et al.*, 2006; Rosen *et al.*, 2010; Guest *et al.*, 2007; de Araujo *et al.*, 2003; Stapleton *et al.*, 2006), auf Grund dessen einige Wissenschaftler Wasser als eigenständige Geschmacksmodalität postulieren (Rosen *et al.*, 2010). Für Ratten konnte eine Temperaturdiskriminierung zwischen 3°C und 6°C gezeigt werden, wobei kaltes Wasser gegenüber warmem Wasser bevorzugt wird (Smith *et al.*, 2009). Aber auch Speichel, der selbst als geschmacklos eingestuft wird, moduliert den Geschmackseindruck (Spielman, 1990; Frank *et al.*, 2008). Wie Frank und Kollegen/innen zeigen konnten, erhöht Speichel die Sensitivität des *Chorda-tympani*-Nervs für Zucker, während die Erregbarkeit durch Bitterstimuli unterdrückt wurde (Frank *et al.*, 2008). Die Vielzahl an Daten, die neben den gustatorischen Informationen durch Geschmacksstimuli im Mundraum kodiert werden, schafft ein komplexes Gefüge, das die Aufklärung der Geschmackskodierung erschwert.

Ob die Weiterleitung der Geschmacksinformationen über Erregungsmuster aller Neuronen (*across-fiber-pattern*-Theorie) oder über qualitätsspezifische Nervenbahnen (*labeled-line*-Theorie) erfolgt und inwieweit eine temporale und/oder chemo-topographische Kodierungen eine Rolle spielen, konnte bis heute – trotz intensiver Bemühungen – nicht abschließend beantwortet werden. Auch ist eine Mischform der Modelle denkbar.

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und G-Proteine in visuellen und gustatorischen Signalkaskaden

Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) ist die größte Familie der membranständigen Rezeptoren und umfasst beim Menschen mehr als 800 Proteine (Venter *et al.*, 2001; Fredriksson *et al.*, 2003; Lefkowitz, 2004, 2007). Zu dieser Rezeptorfamilie gehören lichtaktivierbare Rezeptoren im Auge, Geruchsrezeptoren, Geschmacksrezeptoren sowie Rezeptoren für verschiedene Hormone und Neurotransmitter (bspw. Strader *et al.*, 1994; Sakmar, 1994; Nelson *et al.*, 2001, 2002; Li *et al.*, 2002; Adler *et al.*, 2000; Chandrashekar *et al.*, 2000; Matsunami *et al.*, 2000; Mombaerts, 1999; Buck, 2000). Sie zeichnen sich strukturell durch sieben Transmembranhelices mit jeweils drei extra- und intrazellulären Schleifen, einen extrazellulären N-Terminus und einen auf der cytosolischen Seite der Plasmamembran gelegenen C-Terminus aus (Bockaert & Pin, 1999; Pierce *et al.*, 2002). Allen gemein ist weiterhin die direkte Kopplung aktivierter GPCR mit einem G-Protein, welches die Aktivierung von Effektorenzymen bewirkt, die an der Biosynthese von intrazellulären *second messenger*-Molekülen beteiligt sind.

1.3.1 Gustatorische Signalkaskade

Die Wahrnehmung von umami, süßen oder bitteren Geschmacksstimuli erfolgt über membranständige GPCRs der Klassen I und III (Langerström & Schiöth, 2008), die sich in den Mikrovilli der Epithelzellen in der Geschmacksknospe befinden. Auf gustatorischer Ebene gibt es im Wesentlichen zwei Familien an GPCRs, die für die Detektion von Geschmacksstoffen unterschieden werden: Tas1- und Tas2-Rezeptoren.

Drei Gene kodieren für die Membranproteine der Tas1-Rezeptoren, die funktionell als Heteromere agieren. Das Dimer aus den Rezeptoruntereinheiten Tas1r1 und Tas1r3 bildet einen Rezeptor zur Detektion von L-Aminosäuren, während das Dimer aus Tas1r2 und Tas1r3 als Sensor für Mono- und Disaccharide sowie künstliche Süßstoffe dient. Tas1-Rezeptoren zeichnen sich durch eine lange N-terminale, extrazelluläre Domäne – typisch für GPCR der Klasse III – aus, die die sogenannte *Venus Flytrap*-Struktur formt und für die Bindung zahlreicher Geschmacksstoffe verantwortlich ist (Max *et al.*, 2001). Demgegenüber stehen die zur Klasse I gehörigen Tas2-Rezeptoren (Floriano *et al.*, 2006), die den Tas1-Rezeptoren zumeist zahlenmäßig überlegen sind (Shi & Zhang, 2006). Ihre Anzahl schwankt je nach Spezies zwischen drei Rezeptoren beim Huhn und 66 beim Frosch (Dong *et al.*, 2009; Go *et al.*, 2005; Go, 2006; Shi & Zhang, 2006). Mensch und Maus nehmen mit 36 bzw. 41 Tas2-Rezeptoren, von denen ~ 25 bzw. ~ 35 Rezeptoren funktional sind, eine Zwischenstellung ein (Shi *et al.*, 2003; Behrens & Meyerhof, 2006). Die Verwandtschaft der Bitterrezeptorproteine von Mensch und Maus ist der Abb. 1.4 zu entnehmen.

Charakteristisch für die kodierende Region der *TAS2R*-Gene ist, dass sie nicht durch Introns unterbrochen wird und im Durchschnitt bei Säugetieren ~ 933 bp umfasst (Go, 2006). Sie zeichnen sich durch eine große Strukturdivergenz aus, mit Schwankungen der Aminosäureidentität zwischen 19,2 % und 89,1 % (Go, 2006). Untersuchungen der Lokalisation der *TAS2R*-Gene bei Mensch und Maus zeigten, dass die Verteilung der Rezeptoren in Clustern sehr ähnlich zwischen den Spezies ist.

Die *TAS2R*-Gene sind hierbei nicht zufällig im Genom verstreut, sondern sind überwiegend in Clustern in wenigen Regionen des Genoms angeordnet. Die *Tas2R*-Gene der Maus sind auf Chromosom sechs, zwei und fünfzehn lokalisiert. Während letztere jeweils nur für einen Bitterrezeptor kodieren (*Tas2r134* bzw. *Tas2r119*), liegen auf Chromosom sechs die verbliebenen Gene und Pseudogene in zwei Subclustern – getrennt durch 700 kb – vor. Beim Menschen hingegen verteilen sich die Bitterrezeptorgene auf Chromosom fünf, sieben und zwölf. Bei Betrachtung der Lokalisation von *TAS2R* in beiden Spezies lässt sich erkennen, dass das Hauptcluster der *Tas2rs* der Maus auf Chromosom sechs eine Synthenie zur *TAS2R*-reichen Regionen der humanen Chromosomen sieben und zwölf aufweist, während *Tas2r119* auf Chromosom 15 homolog zu *TAS2R1* auf Chromosom fünf ist (Shi *et al.*, 2003). Einige dieser Rezeptoren stellen die Orthologen dar. Dies lässt den Schluss zu, dass die *TAS2R*-Cluster bereits vor ~ 75 Millionen Jahren präsent waren, bevor sich die gemeinsamen Vorfahren in Primaten und Nagetiere entwickelten (Conte *et al.*, 2003). Die *Tas2rs* der Maus unterlagen in dieser Zeit drei und die humanen *TAS2Rs* zwei Erweiterungen in ihrem Genrepertoire (Abb. 1.4).

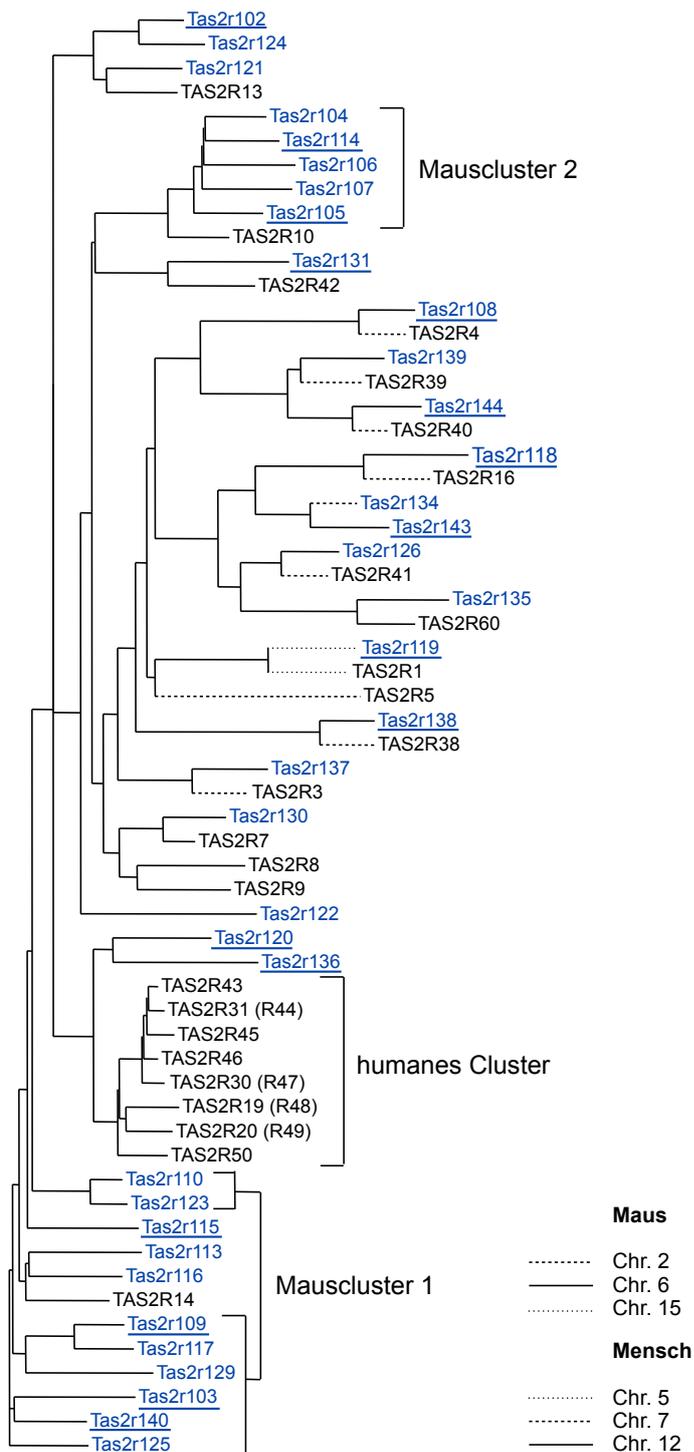


Abb. 1.4. Strukturverwandtschaft und Topologie der TAS2R-Familie des Menschen im Vergleich zur Maus. Die Aminosäuresequenzen der 25 funktionalen menschlichen (schwarz) und 35 murinen Bitterrezeptoren (blau) wurden mit Hilfe der Software AlignX (Vector NTI) verglichen und ihre Verwandtschaft graphisch als Dendrogramm dargestellt. Länge und Entfernung der Äste spiegeln die Sequenzvariabilität der Rezeptoren wieder. Rezeptoren, die Gegenstand der Untersuchung dieser Arbeit waren, sind unterstrichen.

Diese speziesspezifische Variationen des Bitterrezeptorrepertoires sind möglicherweise aus Duplikationen oder Conversion (Umwandlung) hervorgegangen, sowie dem Verlust von Bitterrezeptorgenen geschuldet (*birth-and-death evolution*; Go *et al.*, 2006). Die Unterschiede in der Rezeptorausstattung werden als Anpassung beider Spezies an ihre Umwelt, verstanden und spiegeln wahrscheinlich evolutionäre Prozesse und divergente Selektionsdrücke wider (Go, 2006; Wang *et al.*, 2004). Hierbei spielen für den Menschen nach heutigen Einschätzungen vor allem die Nutzung des Feuers und der damit einhergehende erhöhte Fleisch- und nachlassende Pflanzenverzehr eine entscheidende Rolle (Go, 2006; Wang *et al.*, 2004).

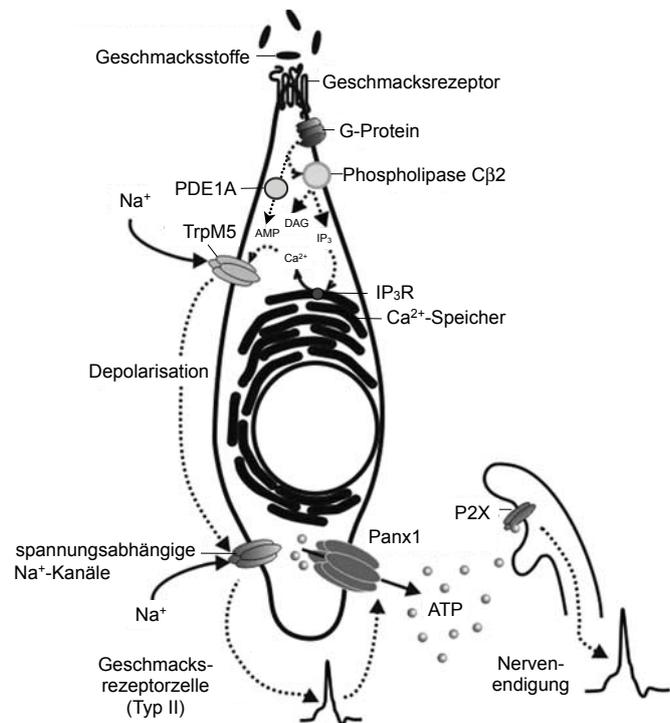
Von *In-vitro*-Studien an humanen Rezeptoren ist bekannt, dass TAS2Rs individuell durch einzelne oder eine Vielzahl an Bitterstoffen aktiviert werden können. Umgekehrt ist ein Bitterstoff in der Lage, mehrere Rezeptoren zu aktivieren (Meyerhof *et al.*, 2010). Hinzu kommen genetische Variabilitäten. Die variierende Genausstattung sowohl bei den Menschen als auch bei unterschiedlichen Mausstämmen bedingt ein unterschiedliches Schmecken. Bekanntestes Beispiel ist der TAS2R38, der vorrangig in zwei Sequenzvarianten auftritt, die in drei Aminosäurepositionen variieren: Pro49Ala, Ala262Val und Val296Ile. Während die PAV-Rezeptorvariante sehr empfindlich auf Bitterstoffe wie Phenylthiocarbamid (PTC) und 6-Propyl-2-thiouracil (PROP)

reagiert, zeigt die AVI-Variante des Rezeptors keine Aktivierung (Kim *et al.*, 2003; Bufe *et al.*, 2005). Ein sogenannter Schmecker weist dabei eine 1000-mal höhere Empfindlichkeit auf als ein Nicht-Schmecker. Die Rezeptorvarianten auf unserer Zunge sind für unsere Wahrnehmungsempfindlichkeit folglich mit ausschlaggebend.

Auch wenn die Rezeptoren für umami, süß und bitter verschieden sind, so gleichen sich ihre intrazellulären Signalkaskaden (Cumming *et al.*, 1996; Herness & Gilbertson, 1999). Die G-Protein-gekoppelten Geschmacksrezeptoren interagieren vorrangig mit dem heterotrimeren G-Protein Gustducin, dessen α -Untereinheit im Ruhezustand ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden hat (Ruiz-Avila *et al.*, 1995). Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung eines Geschmacksstoffes führt zu einem Austausch des GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) an der Gustducin- α -Untereinheit, sowie zur Dissoziation des G-Proteins in α - und $\beta\gamma$ 13-Untereinheit. Die α -Untereinheit initiiert einen cAMP-abhängigen Signalweg durch die Interaktion mit einer Phosphodiesterase (PDE; Li *et al.*, 2002; Ozeck *et al.*, 2004). Diese hydrolysiert cAMP zu 5'-AMP. Der Abfall des cAMP-Spiegels wirkt sich vermutlich auf die Aktivität von cAMP-abhängigen Ionenkanälen der Zelle aus. Clapp und Kollegen/innen fanden weiterhin Anhaltspunkte, dass der Abfall der cAMP-Konzentration stimulierend auf die Aktivität von PLC und von Inositoltrisphosphat-abhängigen Ca^{2+} -Kanälen (IP_3R) wirkt (Clapp *et al.*, 2008). Demgegenüber führt das $\beta\gamma$ 13-Dimer des Gustducins zur Aktivierung der geschmacksspezifischen PLC-Isoform $\beta 2$ ($\text{PLC}\beta 2$; Huang *et al.*, 1999; Rossler *et al.*, 1998; Yan *et al.*, 2001). Das Enzym $\text{PLC}\beta 2$ bedingt die Spaltung des in der Membran befindlichen Phosphatidylinositolbisphosphats (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Der Anstieg der intrazellulären IP_3 -Konzentration führt zur Öffnung von IP_3 -abhängigen Ca^{2+} -Kanälen (IP_3R ; Simon *et al.*, 2006; Roper, 2007), die in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert sind. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt zur Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals TrpM5, der einen Einstrom von Na^+ -Ionen bewirkt (Perez *et al.*, 2003). Die Zunahme positiver Ionen in der Geschmackszelle mündet in einer Depolarisation der Membran, welche die Freisetzung des Neurotransmitters Adenosin-5'-triphosphat (ATP) über Pannexin-Hemikanäle bewirkt (Huang *et al.*, 2007; Romanov *et al.*, 2007; Dando & Roper, 2009; Murata *et al.*, 2010). Dies erlaubt eine Übertragung von Geschmacksinformationen von der Sinneszelle zum Nerv. Ein schematisches Modell der Geschmackskaskade zeigt Abb. 1.5.

Abb. 1.5. Schematische Darstellung der molekularen Prozesse bei der Wahrnehmung von Geschmackseindrücken.

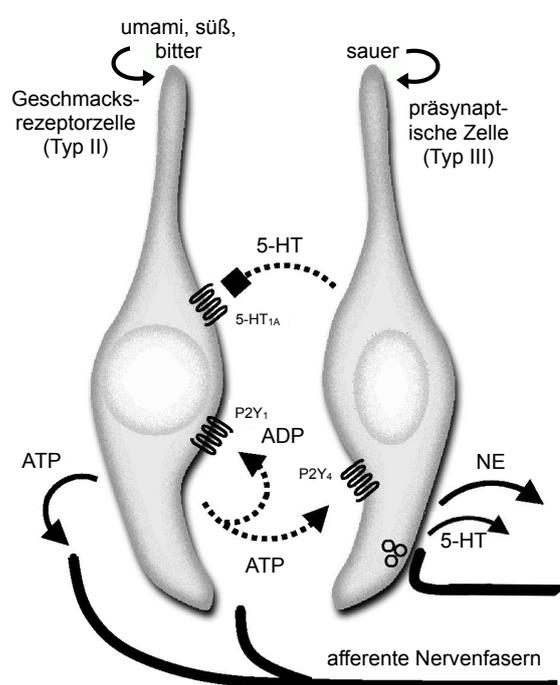
Geschwamsmoleküle der Geschwamsmodalitäten umami, süß und bitter binden an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor in den Mikrovilli der Geschwamsmrezeptorzellen. Die Rezeptorinteraktion bewirkt die Katalysierung eines GDP-GTP-Austausches am G-Protein Gustducin, was die Spaltung des G-Proteins in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit bedingt. Infolgedessen aktiviert die Gustducin- α -Untereinheit die Phosphodiesterase 1A (PDE1A), die zyklisches Adenosinmonophosphat zu Adenosinmonophosphat (AMP) spaltet, während die $\beta\gamma$ -Untereinheit die Phospholipase C β 2 (PLC β 2) aktiviert. PLC katalysiert die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerol (DAG). IP $_3$ bedingt durch die Bindung an IP $_3$ -Rezeptoren (IP $_3$ R) des endoplasmatischen Retikulums (ER) die Freisetzung von Ca $^{2+}$ -Ionen. Die steigende intrazelluläre Ca $^{2+}$ -Konzentration aktiviert den Kationenkanal TrpM5 (transient receptor potential cation channel subfamily M member 5), der einen Einstrom von Na $^+$ in die Zelle vermittelt. Die Geschwamsmrezeptorzelle depolarisiert. Infolgedessen werden weitere spannungsabhängige Na $^+$ -Kanäle aktiviert. Es entsteht ein Rezeptorpotential, das die Freisetzung von ATP über den Hemikanal Pannexin 1 (Panx1) bedingt. Freigesetztes ATP aktiviert seinerseits ATP-gesteuerte Kationenkanäle (P2X-Rezeptoren), die auf Nervenfasern, die die Geschwammsknospe innervieren, lokalisiert sind. (Bild: modifiziert nach Romanov et al., 2007)



Für die Vermittlung von Geschmackseindrücken bindet das von den Geschwamsmrezeptorzellen freigesetzte ATP an P2X $_2$ - und P2X $_3$ -Rezeptoren der die Geschwammsknospen innervierenden Nervenfasern. Die zentrale Rolle von ATP und dessen Rezeptoren wurden 2005 von der Arbeitsgruppe um Thomas Finger bewiesen. Sie zeigten, dass P2X $_{2/3}$ -Knockout-Mäuse einen vollständigen Aktivierungsverlust der afferenten Nervenfasern *Chorda tympani* und *Nervus glossopharyngeus* aufweisen, wenn sie mit Substanzen der fünf Geschwammsqualitäten stimuliert wurden (Finger et al., 2005). Ferner hatten die *Knockout*-Tiere keine Fähigkeiten zur Wahrnehmung von attraktiven und aversiven Substanzen in Präferenztests (Finger et al., 2005; Eddy et al., 2009). Nervenfasern sind nicht der einzige Wirkungsort für ATP. Die freigesetzten Signalmoleküle binden ferner an P2Y-Rezeptoren der präsynaptischen (Typ-III-) Zellen, was vermutlich als *Feedforward*-Signal fungiert. Infolgedessen sekretieren Typ-III-Zellen Serotonin (5-HT; Huang et al., 2005, 2007; Kaya et al., 2004). Die 5-HT-Ausschüttung in Folge einer indirekten Stimulation über Typ-II-Zellen unterscheidet sich nicht von der einer direkten Stimulation durch Säuren (Chen et al., 2011). 5-HT seinerseits reduziert die Ca $^{2+}$ -Mobilisation und ATP-Sekretion von Geschwamsmrezeptorzellen über die Bindung an 5-HT $_{1A}$ -Rezeptoren an Typ-II-Zellen (Huang et al., 2009) und bewirkt über diese Rückkopplungsmechanismen die Inaktivierung von Geschwamsmrezeptorzellen. Das durch die Hydrolyse von ATP entstehende Adenosindiphosphat (ADP) hingegen agiert seinerseits mit den P2Y $_1$ -Rezeptoren der ATP-

produzierenden Zellen (autokrine Wirkung), was als positiver *Feedback*-Mechanismus gedeutet wird (Huang *et al.*, 2009). Die Präsenz von *Feedforward*- und *Feedback*-Mechanismen zeigt die Existenz einer Zell-Zell-Kommunikation innerhalb der Geschmacksknospe (Roper, 2006, 2009), schematisch dargestellt in Abb. 1.6. Neben ATP und 5-HT werden eine Reihe weiterer Neurotransmitter und -peptide wie Noradrenalin (Huang *et al.*, 2008), γ -Aminobuttersäure (GABA; Cao *et al.*, 2009; Starostik *et al.*, 2010, Dvoryanchikov *et al.*, 2011), Glutamat (Vandenbeuch *et al.*, 2010), Cholecystokinin (Herness *et al.*, 2002, 2005), Acetylcholin (Ogura, 2002), vasoaktives intestinales Peptid (VIP; Shen *et al.*, 2005) und Neuropeptid Y (Zhao *et al.*, 2005) von Geschmacksknospenzellen ausgeschüttet. Diese Neurotransmitter könnten an der Weiterleitung von Geschmacksinformationen beteiligt sein, ihre Funktionen sind jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt (Suzuki, 2007; Niki *et al.*, 2011).

Abb. 1.6. Zell-Zell-Kommunikation in der Geschmacksknospe. Die Bindung von Geschmacksstoffen der Geschmacksmodalitäten umami, süß und bitter an ihre entsprechenden Rezeptoren bedingt die Freisetzung von ATP über Pannexin 1 aus Typ-II-Zellen der Geschmacksknospe. Extrazelluläres ATP stimuliert einerseits die ATP-Rezeptoren (P2X) auf den sensorischen Nervenfasern, die die Geschmacksknospe innervieren, und andererseits ATP-Rezeptoren (P2Y₄) angrenzender Typ-III-Zellen (parakrine Wirkung). ATP wird durch die NTPDase 2 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2), eine Plasmamembrangebundene Nukleotidase der Typ-I-Zellen, hydrolysiert. Das aus der Hydrolyse hervorgehende ADP kann seinerseits über ADP-Rezeptoren (P2Y₁) ein Feedback an die Rezeptorzellen vermitteln (autokrine Wirkung). Die Stimulation von präsynaptischen Zellen (Typ III) mit extrazellulärem ATP oder Säuren führt zur Freisetzung von Serotonin (5-HT) und Noradrenalin (NE). 5-HT wirkt über den Serotoninrezeptor 1A (5-HT_{1A}) negativ auf die Typ-II-Zellen zurück. Noradrenalin scheint nicht an der Feedback-Regulation in der Geschmackskommunikation beteiligt zu sein. (Bild: modifiziert nach Huang *et al.*, 2009)



Darüber hinaus zeigen ein Vielzahl neuerer Studien, dass Peptidhormone, die ursprünglich vorrangig im Gastrointestinaltrakt identifiziert wurden, in der Lage sind, die Transduktion von Geschmacksstoffen in der Geschmacksknospe zu modulieren. Zu ihnen zählen Leptin (Ninomiya *et al.*, 2002; Horio *et al.*, 2010), Ghrelin (Shin *et al.*, 2010), *Glucagon-like peptide 1* (GLP1; Martin *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2008), Orexin (Matsuo *et al.*, 2010), Oxytocin (Sinclair *et al.*, 2010) und Endocannabinoide (Yoshida *et al.*, 2010; Matias *et al.*, 2008). Die Freisetzung dieser Peptidhormone könnte entscheidend die Wahl und die Menge der zu konsumierenden Nahrungsmittel verändern.

1.3.2 Visuelle Signalkaskade

Im Zuge dieses Projektes sollten Geschmacksrezeptorzellen durch Photorezeptoren ersetzt werden. Der Photorezeptor Rhodopsin (Rho), der bereits 1878 als „Sehpurpur“ beschrieben wurde, war der erste strukturell beschriebene GPCR (Marmor & Martin, 1978; Menon *et al.*, 2001). Rho ist eines der Sehpigmente in der Retina – ein Nervengewebe auf dem Augenhintergrund – von Wirbeltieren und gehört zur GPCR-Klasse I (Rho-ähnliche GPCRs), die 90 % der GPCRs umfasst. Das Sehpigment ist in den Stäbchenzellen des Auges exprimiert und vermittelt das Sehen bei geringer Helligkeit, das skotopische Sehen. Stäbchenzellen sind mit einem Anteil von 97 % die dominierenden Sinneszellen der Retina (Carter-Dawson & Lavail, 1979). Einzig in der Fovea (gelber Fleck) der Netzhaut sind keine Stäbchenzellen lokalisiert. Neben den Stäbchen besitzen Säuger spezialisierte Sinneszellen, die an der Realisierung des Farbsehens, dem photopischen Sehen, beteiligt sind. Jene Sinneszellen werden als Zapfen bezeichnet und können in verschiedene Subtypen untergliedert werden. Bis bis zu sechs solcher Zapfentypen konnten in einer Spezies (Huhn) beschrieben werden, jedoch sind diese nur bei wenigen Organismen angelegt (Nathans, 1999; Yokoyama, 2000). Beim Menschen werden drei Zapfenarten unterschieden, der S-Typ (*short wavelength sensitive*, sws), der M-Typ (*medium wavelength sensitive*, mws) und der L-Typ (*long wavelength sensitive*, lws), die sich in ihrer spektralen Empfindlichkeit unterscheiden. Die Maus besitzt demgegenüber nur zwei Zapfensehpigmente, den S-Typ (Sensitivitätsmaxima bei 359 nm; Chiu *et al.*, 1993; Jacobs *et al.*, 1991; Yokoyama *et al.*, 1998) und den M-Typ (Sensitivitätsmaxima bei 508 nm; Sun *et al.*, 1997). Während die meisten Säuger inklusive Primaten die einzelnen Zapfenpigmente in individuellen Zapfen exprimieren (*one cone-one visual pigment-rule*), liegt bei Nagern zumeist eine Koexpression der Zapfenopsine in denselben Sehzellen vor (Röhlich *et al.*, 1994). Das Verhältnis variiert hierbei abhängig von der Lage in der Retina (Szel, 1992). Ferner weisen Mäuse im Gegensatz zu den meisten Säugetieren keine Opsin-mws-dominierte Retina mit einem mws:sws-Verhältnis von ~ 10:1 auf. Vielmehr überwiegt das Opsin sws im Verhältnis von 3:1 zum Mws-Opsin (Applebury *et al.*, 2000).

Die Zapfen und Stäbchen bauen sich aus einer Synapse, einem Innen- und einem Außensegment auf. Während das Innensegment die Ausstattung zellulärer Organellen für Energiestoffwechsel und Proteinsynthese wie Mitochondrien, Nucleus und endoplasmatisches Retikulum beherbergt, stellt das Außensegment ein dicht gepacktes Membransystem (gebildet aus isolierten Membransäckchen – den *Disks* – in den Stäbchen und Ausstülpungen der Plasmamembran der Zapfen) dar, in welchem Sehpigmente in sehr hoher Dichte eingelagert sind. Das Außensegment agiert folglich als Lichtdetektor, der alle molekularen Komponenten enthält, die für die Absorption von Licht und die Umwandlung des Reizes in ein biologisches Signal erforderlich sind. Die funktionellen Photorezeptoren der Außensegmente setzen sich dabei aus einem Proteinanteil, dem Opsin, und einem Chromophor, dem Retinal, zusammen. Das Retinal – bei Säugetieren 11-*cis*-Retinal – ist ein Vitamin-A-Derivat, welches unter Bildung einer Schiffschens Base kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Opsin bindet und als lichtabsorbierendes Molekül fungiert (Dartnall & Lythgoe, 1965). Pures Retinal besitzt ein Absorptionsspektrum von 380 nm. Die Wechselwirkungen mit dem Opsin verändern die

elektronische Struktur des Retinals und bedingen eine Verschiebung des Absorptionsspektrums in den sichtbaren Bereich des Lichts (Kropf & Hubbard, 1959; Mathies & Stryer, 1976).

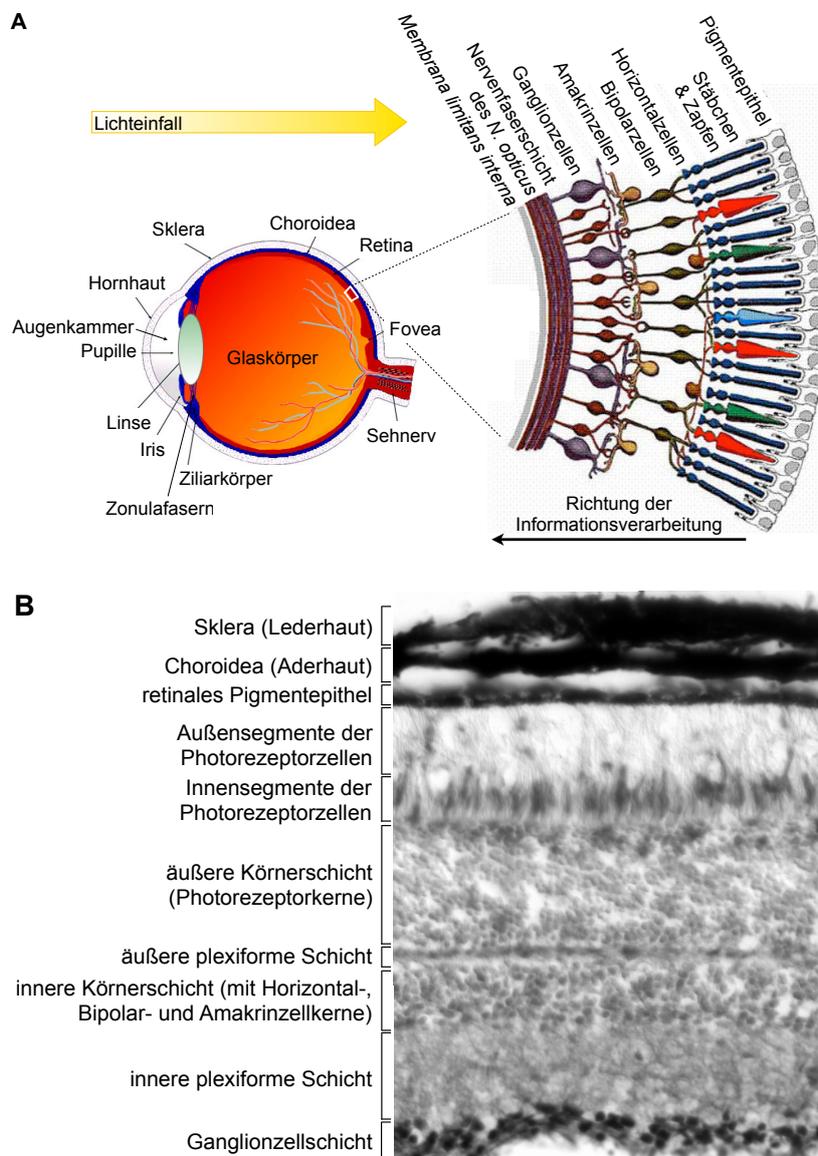


Abb. 1.7. Schematischer Aufbau des Wirbeltierauges.

(A) Der Sehprozess beruht auf der Absorption von Licht durch Photorezeptoren im Auge. Um diese in der Retina gelegenen und dem Licht abgewandten Photorezeptoren zu aktivieren, muss das auf das Auge fallende Licht brechende Flächen und Medien des Auges (Hornhaut, vordere Augenkammer, Linse und Glaskörper) durchdringen (links) und wird dabei auf der Retina abgebildet. In der Retina werden die physikalischen Reize (elektromagnetische Wellen) in Erregungen umgewandelt, die ihrerseits über den Sehnerv in das Sehzentrum zum Großhirn geleitet werden. Die schematische Darstellung der Netzhaut (rechts) zeigt die Lage der Nervenzellen, als auch ihre synaptischen Kontakte. (Bild: modifiziert nach www.webvision.med.utha.edu) (B) Histologisches Bild eines Querschnitts durch die Retina der Maus.

Die Übertragung visueller Signale, die sogenannte photoelektronische Transduktion,

beginnt mit Licht, welches auf das Auge fällt, wo es die Hornhaut, die vordere Augenkammer, die Linse und den Glaskörper durchdringt, bevor es die Photorezeptoren der Retina aktiviert (siehe Abb. 1.7).

Die Absorption eines Photons führt zur *cis-trans*-Isomerisation des gewinkelten 11-*cis*-Retinals in die gestreckte *all-trans*-Form (Gether *et al.*, 1998). Jene Isomerisierung löst die visuelle Signalkaskade aus, die schematisch der Abb. 1.8 entnommen werden kann.

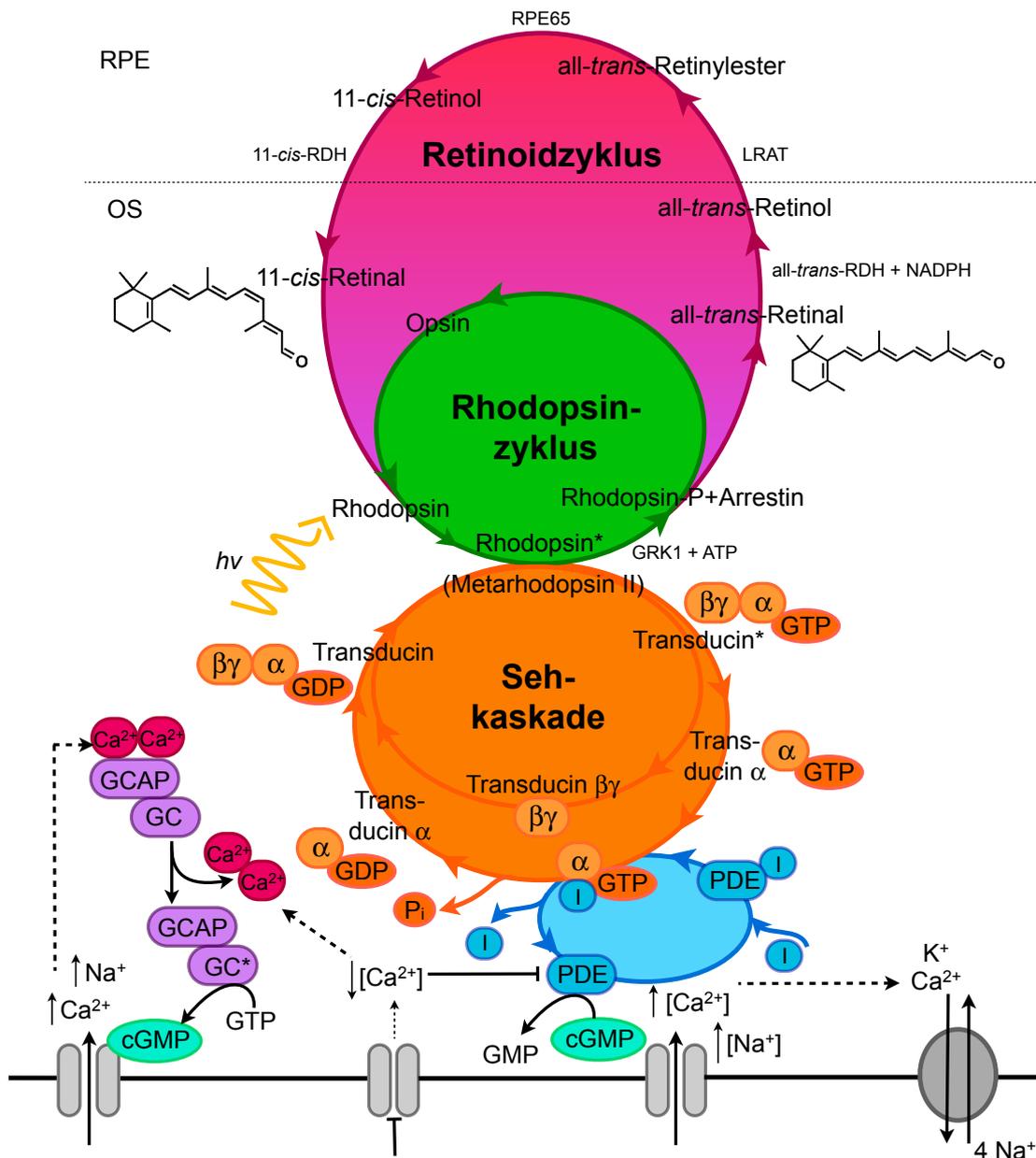


Abb. 1.8. Schematische Darstellung der molekularen Prozesse bei der Wahrnehmung von Licht. Die Sehkaskade beruht auf dem Ineinandergreifen von Retinoidzyklus (pink) zur Generierung des lichtsensitiven Retinals, Rhodopsinzyklus (grün) zur Bildung eines funktionellen Rhodopsins (Rho) und der Initiation der Signalkaskade über die Kopplung eines G-Proteins (orange) nach der Exposition der Sehzellen mit Licht.

Durch die Absorption von Licht isomerisiert das Chromophor 11-cis-Retinal, welches kovalent an das Sehpigment Rho gebunden ist, in all-trans-Retinal und aktiviert auf diese Weise das Sehpigment. Das aktivierte Rho (Metarhodopsin II) katalysiert den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) am G-Protein Transducin (Hargrave et al., 1993; Arshavsky et al., 2002), welches daraufhin in die α-GTP-Untereinheit und die βγ-Untereinheit zerfällt. Die α-GTP-Untereinheit aktiviert die membranständige cGMP-Phosphodiesterase (PDE), indem es an dessen inhibitorische Untereinheit (I) bindet und diese entfernt. Die aktivierte PDE spaltet zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu Guanosinmonophosphat (GMP). Der rasche Abfall der cGMP-Spiegel bedingt die Schließung cGMP-abhängiger Kationenkanäle, was den weiteren Einstrom von Na⁺ und Ca²⁺ in das Stäbchensegment unterbindet. Die Spannungsänderung wird passiv über das Innensegment zur Synapse weitergeleitet. Infolge der Hyperpolarisation wird die Ausschüttung von Glutamat am synaptischen Ende der Photorezeptorzelle eingestellt und diese Veränderung der Neurotransmittersituation über nachgeschaltete Interneurone (Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen)

und Ganglienzellen, die den Nervus opticus bilden, an das Gehirn weitergeleitet (Saari, 2000; Fu & Yau, 2007; McBee et al., 2001). Das kontinuierliche Ausströmen von Ca^{2+} durch den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher in der Membran der Sehzelle reduziert weiter die Konzentration von Ca^{2+} im Cytosol. Der herabgesetzte Ca^{2+} -Spiegel bedingt die Aktivierung der Guanylylcyclase (GC), die die Synthese von cGMP aus GTP katalysiert und hemmt die PDE. Die Aktivität der GC wird von dem Ca^{2+} -bindenden Protein guanylyl cyclase-activating protein (GCAP) reguliert (Cuenca et al., 1988). Das inhibitorisch agierende Protein verliert auf Grund der Ca^{2+} -Knappheit sein gebundenes Ca^{2+} , was die Abkopplung von der GC zur Folge hat. Die neuerliche Produktion von cGMP initiiert die erneute Öffnung cGMP-abhängiger Ca^{2+} - und Na^+ -Kanäle im Außensegment und die Ausschüttung von Glutamat an der Synapse. Für die weitere Regeneration des optischen Apparates wird GTP durch die GTPase-Aktivität der α -Transducin-Untereinheit zu GDP hydrolysiert. Infolgedessen liegt Transducin inaktiv vor, was die Freisetzung der PDE bedingt, die nun ebenfalls in ihren inaktiven Zustand zurückkehrt. Rho wird seinerseits durch die Rho-Kinase GRK1 im Rho-Zyklus phosphoryliert, was einer weiteren Aktivierung von Transducin entgegenwirkt. Die Phosphorylierung des Rho, die verstärkt bei niedrigem Ca^{2+} -Spiegel auftritt, bedingt die Bindung des Proteins an Arrestin (Kuhn & Wilden, 1987). Rho wird inaktiviert und das all-trans-Retinal freigesetzt. All-trans-Retinal wird seinerseits im Retinoidzyklus des äußeren Augensegmentes (OS) und Pigmentepithel (RPE) in vier katalytischen Prozessen in 11-cis-Retinal umgewandelt (Lamb & Pugh, 2004), welches erneut an Opsin binden kann. ATP, Adenosintriphosphat; RDH, Retinol-Dehydrogenase; LRAT, Lecithin:Retinol-Acetyltransferase; RPE65, retinales Pigmentepithel-spezifisches Protein 65; hv, Energie; *, aktiviert. (Bild basierend auf McBee et al., 2001)

Prinzipiell unterscheiden sich die Signalwege in den Stäbchen und Zapfen kaum (Yau, 1994; Luo et al., 2008), jedoch existieren verschiedene Isoformen für die Signalproteine α -Transducin, $\beta\gamma$ -Transducin, die PDE und die cGMP-abhängigen Ionenkanäle in den zwei Photorezeptorzellen (Kawamura & Tachibanaki, 2008; Yau & Hardie, 2009). Hierdurch ergeben sich kinetische Unterschiede in den Signalkaskaden von Stäbchen und Zapfen. Zapfen sind im Vergleich zu Stäbchen 20- (Mensch) bis 10000-mal (Maus) weniger lichtempfindlich (Nathan et al., 2006). Auch fällt die Antwort auf die Absorption eines Lichtquants bei den Zapfen deutlich geringer aus (Baylor, 1987), sodass es mehr als eines einzelnen Lichtquants bedarf, um das Signal zu detektieren. Zapfen vermitteln ihre Lichteindrücke jedoch deutlich schneller (Kawamura & Tachibanaki, 2008). So verläuft die Lichtantwort in den Zapfen innerhalb weniger Millisekunden, während in den Stäbchen dieser Prozess bis zu 100 ms umfasst (Kuwayama et al., 2002; Imai et al., 1997). Diese Variationen der Zapfenopsine im Vergleich zu Rho gewährleisten eine optimale Anpassung und eine hohe zeitliche Auflösung bei ausreichender Beleuchtung.

1.3.3 G-Proteine in visuellen und gustatorischen Signalkaskaden

So unterschiedlich das Ligandenspektrum und die Funktionen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auch sind, ist ihnen neben ihrer heptahelikalen Struktur stets die Aktivierung von G-Proteinen gemein. Die Ähnlichkeiten zwischen dem G-Protein der Geschmackskaskade, Gustducin, und der Sehkaskade, Transducin, wurden bereits zum Zeitpunkt der Entdeckung von Gustducin im Jahr 1992 erkannt (McLaughlin et al., 1992). Die Sequenzidentität der beiden Proteine von 80 % führte bereits damals zu Spekulationen über Ähnlichkeiten der Seh- und Geschmackskaskade (McLaughlin et al., 1992; Spielman, 1998).

Erste *In-vitro*-Analysen umfassten Bindungsstudien von bovinem α -Transducin bzw. α -Gustducin der Ratte mit bovinem Rho, mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit des retinaspezifischen G-Proteins und der bovinen cGMP-PDE der Retina (PDE6; Hoon *et al.*, 1995). Weiterhin wurde die intrinsische GTPase-Aktivität beider G-Proteine analysiert (Hoon *et al.*, 1995). Allen Untersuchungen gemein war die analoge biochemische Wirkungsweise beider Proteine, was die Hypothese aufwarf, dass sich beide G-Proteine funktionell ersetzen könnten. Diese Annahme wurde durch Experimente Mitte der 90er Jahre erhärtet. So konnte mittels GTP γ S-Bindungsstudien gezeigt werden, dass Transducin in Anwesenheit von Zellmembranen bovinen Geschmacksgewebes *in vitro* durch Bitterstoffe aktiviert werden kann (Ruiz-Avila *et al.*, 1995; Ming *et al.*, 1998).

Der Nachweis von zahlreichen G-Proteinen – einschließlich α -Transducin, wenn auch nur in einem Verhältnis von 1:25 im Vergleich zu Gustducin – in Geschmacksrezeptorzellen untermauerte weiter das Bild der funktionellen Gleichartigkeit (Ruiz-Avila *et al.*, 1995). Zunehmende Gewissheit erwuchs durch Studien an transgenen Mausmodellen. So führte der *Knockout* von α -Gustducin in elektrophysiologischen Untersuchungen und Verhaltenstests zu einer reduzierten Geschmackswahrnehmung von bitter und süß (Wong *et al.*, 1996). Das Ausbleiben eines vollständigen Geschmacksverlustes ließ die Autoren argumentieren, dass andere G-Proteine den Verlust von Gustducin partiell ausgleichen. Dies wurde durch die Generierung einer α -Gustducin-*Knockout*-Maus, die unter dem α -Gustducin-Promotor α -Transducin exprimiert, bestätigt. Im *Two-bottle preference*-Verhaltenstest konnte für jene Tiere gezeigt werden, dass die Expression von α -Transducin das Ausmaß des α -Gustducin-*Knockout*-bedingten Geschmacksverlustes abmildern kann (He *et al.*, 2002). Analysen wie diese veranschaulichten klar, dass α -Transducin α -Gustducin zumindest eingeschränkt funktionell in Geschmacksrezeptorzellen ersetzen kann.

Im Auge hingegen, wo Transducin ursprünglich identifiziert wurde, konnte bis vor kurzem α -Gustducin in der Retina, weder per RT-PCR, *RNase-protection-Assay* noch mit immunhistochemischen Analysen nachgewiesen werden (McLaughlin *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2006). Neueste Untersuchungen auf Basis von *Western Blot* und mittels Immunhistochemie jedoch belegen eine Expression von α -Gustducin in den terminalen Enden der bipolaren Zellen der Stäbchen (Son *et al.*, 2011).

1.4 Zielstellung

Die Geschmackswahrnehmung ist ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Sinneseindrücke, die im letzten Jahrzehnt intensiven Forschungen unterlag. Zwar gelang es bisher nicht, die gustatorischen Kommunikationsbahnen auf zellulärer Ebene aufzuzeigen, dennoch konnten wesentliche gustatorische Areale im zentralen Nervensystem und Geschmacksrezeptoren (Tas1- und Tas2-Rezeptoren), die verschiedene Geschmacksstoffe (v. a. bitter) vermitteln, identifiziert werden. Während bei der Identifizierung von Liganden der Fokus vorrangig auf dem Menschen lag (Chandrashekar *et al.*, 2000; Bufe *et al.*, 2002, 2005; Kim *et al.*, 2003; Behrens *et al.*, 2004, 2009; Kuhn *et al.*, 2004; Pronin *et al.*, 2004, 2007; Brockhoff *et al.*, 2007; Sainz *et al.*, 2007), wurden die Analysen zur Weiterleitung von Geschmacksinformationen primär am Mausmodell realisiert.

Eine detaillierte Aufklärung der Geschmacksverarbeitung und -kodierung wird v. a. dahin gehend erschwert, da die neuronale Aktivierung von Geschmacksstoffen durch verschiedene assoziierte Stimuli (siehe Kapitel 1.2) beeinflusst wird.

Um solche geschmacksstoffassoziierten Stimuli in der Analyse von gustatorischen Kommunikationsbahnen auszuschließen, wäre die Induktion der Geschmackskaskade durch einen rein biophysikalischen Stimulus wie z. B. Licht nötig.

Basierend auf diesem Gedanken sollte im Zuge dieser Arbeit die kodierende Sequenz von Geschmacksrezeptoren durch Opsine, deren Proteine durch Licht spezifischer Wellenlänge angeregt werden können, ersetzt werden.

Die Arbeit hatte zum Ziel:

1. Liganden von murinen Bitterrezeptoren unter Zuhilfenahme eines heterologen Expressionssystems zu identifizieren, um eine Übertragbarkeit von Ligandenspektren humaner Bitterrezeptoren auf die orthologen Rezeptoren der Maus zu prüfen.
2. die Funktionalität von Photorezeptoren anstelle von Geschmacksrezeptoren in der Geschmackskaskade *in vitro* zu evaluieren und wenn diese gegeben ist
3. drei genetisch veränderte Mäuse mit einem modifizierten *Tas1r1*-, *Tas1r2*- bzw. *Tas2r114*-Locus zu generieren.

Die Exposition der Zunge dieser Tiere mit Licht definierter Wellenlänge sollte die Geschmackskaskade – unabhängig vom Einfluss geschmacksstoffassoziierten Stimuli – in diesen Mausmodellen aktivieren. Damit wäre ein System geschaffen, dass es erlauben würde, geschmacks- und qualitätsspezifische, neuronale Netzwerke und Hirnareale zu identifizieren. Zusätzlich könnten diese Mausmodelle zur Aufklärung der neuronalen Kodierung innerhalb des gustatorischen Systems beitragen.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Die für die Laborarbeit eingesetzten Materialien stammen, sofern nicht anders erwähnt, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) oder VWR (Darmstadt). Die für die Herstellung der verschiedenen Reagenzien benötigten Chemikalien und Lösungsmittel besaßen Analysequalität. Letztere wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) oder VWR (Darmstadt) bezogen.

2.2 Geschmacksstoffe

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Geschmacksstoffe wurden käuflich erworben oder von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (Tab. 2.1). Die Lösung dieser Stoffe erfolgte für die Zellkulturexperimente in C1-Puffer und für die Charakterisierung der Mausmodelle in Wasser (vgl. Tab. 8.1). Die Geschmacksstoffe wurden jeweils bei Raumtemperatur (RT) eingesetzt.

Tab. 2.1. Bezugsquellen der verwendeten Geschmacksstoffe.

Bezugsquelle	Geschmacksstoff
ABCR (Karlsruhe)	Solanidin
Aldrich (Taufkirchen)	Acetylpyrazin, Denatoniumbenzoat, Dimethylsulfon, Ethylpyrazin, Helicin, Phenylethylisothiocyanat, Phenylthiocarbamid, Sucroseoctaacetat
Apin Chemicals (Abingdon; UK)	Cucurbitacin B, D, E und I, Quassin
BioChemica (Darmstadt)	Bacitracin, Taurocholsäure
Chromadex (LGC Standard, Wesel)	Amarogentin, Costunolid
Daniel Intelmann (München)	Humulon
Fluka (Oberhaching)	Acesulfam K, Allylisothiocyanat, Ascorbinsäure, Betain, Biotin, Campher, Chininsulfat, Chlorhexidin, Crotalin, Emetin, Genistein, Genistin, Ginkgolid A, Natriumbenzoat, Ouabain, Pilocarpin, Salicin, Salicylsäure, Taurin, α -Thujon, Xanthotoxin
Giovanni Appendino (Novara, I)	Absinthin, Arborescin, Arglabin, Cascarellin, Falcarindiol, Parthenolid, Tatridin A & B
ICN Biochemicals (Aurora, USA)	Pantothenensäure
Roth (Karlsruhe)	Cnicin, Eriodyctiol, Natriumchlorid, Zitronensäure

Bezugsquelle	Geschmacksstoff
Sigma (Taufkirchen)	Aloin, D-Amygdalin, Andrographolid, Androsteron, Arbutin, Aristolochiasäure, Atropin, Azathioprin, Berberin, Brucin, β -Carotin, Chloramphenicol, Chlorogensäure, Chloroquin, Chlorpheniramin, Cobalamin, Coffein, Colchicin, Cortison, Coumarin, Creatinin, Cucurmin, Cycloheximid, Denatoniumsaccharid, Dicumarol, Digitonin, Diphenidol, Docosahexaensäure, Epicatechin, Epigallocatechingallat, Erythromycin, Folsäure, L-Glutamat, Indol-3-essigsäure, Indol-3-carbinol, Lidocain, Limonin, Naringin, Neohesperidin, Nicotin, Noscain, Papaverin, Phenanthrolin, Phenyl- β -D-Glucose, Picrotin, Picrotoxinin, Progesteron, 5-Propyl-2-thiouracil, 6-Propyl-2-thiouracil, Pyridoxin, Pyrocatechol, Resveratrol, Riboflavin, Saccharose, α -Santonin, Sinigrin, Solanin, Spartein, Strychnin, L-Sulforaphan, Tanninsäure, Theobromin, Theophyllin, Thiamin, Trigonellin, Yohimbin

2.3 Enzyme und Antikörper

2.3.1 Enzyme

Tab. 2.2. Bezugsquellen der zum Einsatz gekommenen Enzyme.

Enzym	Hersteller
<i>Advantage 2</i> Polymerase Mix	Clontech, Heidelberg
DNase I (RNase-frei) (1 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
Dispase II (2,4 U/mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
Klenow-Fragment (10 U/ μ l)	Fermentas, St. Leon-Rot
Kollagenase A (10 U/mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kollagenase NB (0,27 U/mg)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Kollagenase IA (693 U/mg)	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase NB 4G (0,27 U/mg)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<i>PfuTurbo</i> -Polymerase (2,5 U/ μ l)	Stratagene, Amsterdam (NL)
Proteinase K, rekombinant (50 U/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K, rekombinant (30 U/mg)	Roth, Karlsruhe
Restriktionsnukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt/M.
Reverse Transkriptase <i>Superscript</i> II (200 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
RiboLock Ribonuklease-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuklease A (RNase A, 40 U/mg)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-Inhibitor (RNasin, 40 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Shrimp</i> Alkalische Phosphatase (1 U/ μ l)	Roche Diagnostics, Mannheim
T3-Polymerase (20 U/ μ l)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase (5 U/ μ l)	Roche Diagnostics, Mannheim
T4-DNA-Ligase (400 U/ μ l)	New England Biolabs, Frankfurt/M.

Enzym	Hersteller
T4-Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt/M.
T7-Polymerase (20 U/μl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq-Polymerase (5 U/μl)	Invitex, Berlin
Trypsin	Biochrom AG, Berlin
Trypsin mit EDTA-4Na	Invitrogen, Karlsruhe
Turbo DNase (2 U/μl)	Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt)

2.3.2 Antikörper

Tab. 2.3. Bezugsquellen und Verdünnungen der zum Einsatz gekommenen Antikörper.

Epitop	Wirtsspezifität	Art	konjugierte Gruppe	Hersteller	Verdünnung	Anwendung
AADC	Kaninchen	polyklonal		Gene Tex (GTX30448)	1:500	ICC
Biotin		polyklonal	Streptavidin-Alexa Fluor 633	Molecular Probes (S-21375)	1:1000 1:300	ICC IHC
Biotin		polyklonal	Streptavidin-Alka- line Phosphatase	Sigma (S2890)	1:200	TSA-ISH
Biotin		polyklonal	Streptavidin-Alexa Fluor 488	Invitrogen (S32354)	1:500	TSA-IHC
Digoxigenin	Schaf	Fab	Alkaline Phosphatase	Roche (1093274)	1:750	ISH
Digoxigenin	Schaf	Fab	Meerrettich- Peroxidase	Roche (1207733)	1:500	TSA-ISH
Galpha Gustducin	Kaninchen	polyklonal		Santa Cruz (sc-395)	1:300	IHC
HSV	Maus	mono- klonal		Novagen (69171)	1:15000	ICC
Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A11034)	1:500	IHC
Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	Alexa Fluor 546	Molecular Probes (A11010)	1:500	IHC
Kaninchen IgG	Ziege	polyklonal	Alexa Fluor 633	Molecular Probes (A21071)	1:300	IHC

Epitop	Wirts- spezifität	Art	konjugierte Gruppe	Hersteller	Verdün- nung	Anwen- dung
Kaninchen IgG	Esel	polyklonal	Alexa Fluor 647	Molecular Probes (A31573)	1:300	IHC
Rho	Maus	mono- klonal		von Dietmar Krautwurst, München	1:5000	IHC
Maus IgG	Ziege	polyklonal	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A-11029)	1:2000	ICC
Maus IgG	Pferd	polyklonal	Biotin	Vector La- boratories (BA-2001)	1:500	ICC
NTPDase 2	Kaninchen	polyklonal		von Jean Sévigny, CAN	1:1000	IHC
Opsin mws/lws	Ziege	polyklonal		Santa Cruz (sc-14363)	1:200 & 1:50	IHC
Opsin mws	Kaninchen	polyklonal		Novus Biological (NB110-74730)	1:200 & 1:50	IHC
Opsin sws	Ziege	polyklonal		Santa Cruz (sc-22117)	1:500	IHC
Ziege IgG	Esel	polyklonal	Alexa Fluor 488	Molecular Probes (A11055)	1:500	IHC
Ziege IgG	Esel	polyklonal	DSB X Biotin	Molecular Probes (D206989)	1:500	TSA-IHC

2.4 Kits

Tab. 2.4. Bezugsquellen der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
ABC Vectastain Elite Kit	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
<i>GFX PCR DNA and Gelband Purification Kit</i>	GE Healthcare, Freiburg
Megaprime DNA Labeling System, dCTP	GE Healthcare, Freiburg
MicroPoly(A)Purist™ Kit	Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt)
<i>MEGAclear™ Kit</i>	Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt)
mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra	Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt)
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond PC 100	Macherey-Nagel, Düren
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel, Düren
<i>rAPid DNA Dephos and Ligation Kit</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Poly(A) Tailing Kit</i>	Ambion (Applied Biosystems, Darmstadt)
<i>TOPO-TA Cloning® Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe
TSA™ INDIREKT Biotin-Tyramid-System	Perkin-Elmer, Boston (USA)
TSA™ Plus Biotin-Tyramid-System	Perkin-Elmer, Boston (USA)
<i>Vector M.O.M. Immundetection Kit</i>	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
<i>Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.5 Plasmide

Tab. 2.5. Bezugsquellen der verwendeten Plasmide.

Plasmid	Hersteller
pACN	Dr. Ulrich Böhm (ZMNH), Hamburg
pBluescript II KS+	Stratagene, Amsterdam (NL)
pcDNA5 FRT	Invitrogen, Karlsruhe
pCR-Blunt II-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pCR-2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe
pEAK 10	Edge Biosystem, Gaithersburg (USA)
pGEMHE5	Liman <i>et al.</i> , 1992
PIRES-hrGFPII	Stratagene, Amsterdam (NL)
pKO Scrambler V901-DTA	<i>Lexicon Genetics Incorporated, The Woodlands (USA)</i>

Für die heterologe Expression von Bitterrezeptoren wurde neben dem Plasmidvektor pEAK 10 der Expressionvektor pcDNA5/FRT von Invitrogen herangezogen. Dieser wurde von Dr. Bernd Bufe durch Einbringung einer Klonierungskassette und einer Punktmutation bei 1831 bp modifiziert. Die Punktmutation bedingt den Verlust der *EcoRI*-Schnittstelle an dieser Position und ermöglicht die Nutzung der *EcoRI*-Schnittstelle in der *multiple cloning site* als singuläre Schnittstelle. Zwischen dieser und *HindIII* wurde ein *SST-Tag* eingefügt, das für die 45 N-terminalen Aminosäuren des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 der Ratte kodiert. Die Sequenz enthielt ein Zielsteuerungsmotiv, das die Plasmamembranlokalisierung heterolog exprimierter Bitterrezeptoren verbessert (Ammon *et al.*, 2002; Bufe *et al.*, 2002). Jener Sequenz folgte stromabwärts die kodierende Region der Bitterrezeptorgene ohne endogenes Stoppcodon. Die analysierten Bitterrezeptoren basierten vorrangig auf den Rezeptorsequenzen des C57BL/6-Mausstammes (siehe Anhang, 8.4.1). Abweichend hiervon wurden für Tas2r103 (Plasmid von Jean-Pierre Montmayeur, Dijon, F) bzw. Tas2r102 und Tas2r115 die Rezeptorsequenzen des SWR-Stammes bzw. des DBA-Mausstammes verwendet. Unter Erhaltung des Leserahmens schloss sich an die Rezeptorsequenz eine *NotI*-Restriktionsschnittstelle und ein *HSV-Tag* für die immunhistologische Detektion der heterolog exprimierten Rezeptoren an. Die 30 bp umfassende Sequenz des *HSV-Tags* kodierte für das Glycoprotein-D-Epitop des *Herpes simplex*-Virus (HSV).

Im Zuge der *Targeting*-Vektor-Generierung kam der Vektor pKO Scrambler V901-DTA, der von Dr. Ulrich Boehm zur Verfügung gestellt wurde, zum Einsatz. Dieser enthielt ein Resistenzgen für das Antibiotikum Ampicillin (Amp R) und ein Diphtheriatoxin A-(DTA)-Fragment-Gen. DTA ist ein Exotoxin des *Corynebacterium diphtheriae*, welches den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 inaktiviert, dadurch die Translation in eukaryotischen Zellen inhibiert und so zum Tod dieser Zellen führt (Pappenheimer, 1977; Boquet *et al.*, 1977). DTA wurde in der ES-Zellkultur zur Negativselektion eingesetzt (Yagi *et al.*, 1990).

2.6 Oligonukleotide (Primer)

Die für die Durchführung von PCRs benötigten Oligonukleotide wurden anhand von Genominformationen aus den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov) und des Ensembl-Projektes (www.ensembl.org) ermittelt. Die Sequenz für die Generierung der *In-situ*-Hybridisierungssonde Tas1r1 wurde dem *Allen Brain Atlas* (www.brain-map.org) entnommen. Mit Hilfe der Vector NTI-Software wurden die Primersequenzen auf ihre Eignung hinsichtlich Schmelztemperatur (50°C bis 67°C, ohne Berücksichtigung zusätzlich eingefügter Restriktionsschnittstellen) und GC-Gehalt (45 % bis 55 %) sowie der Ausbildung von Sekundärstrukturen geprüft und von der Firma Eurofins MWG Operon (Martinsried) lyophilisiert bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind der Tab. 8.2 im Anhang zu entnehmen.

2.7 Größenstandards

Tab. 2.6. Bezugsquellen der verwendeten Größenstandards.

Standard	Hersteller	Verwendung
1 kb DNA-Leiter (1 µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe	<i>Southern Blot</i>
GeneRuler DNA-Leiter-Mix (0,5 µg/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot	DNA-Gelelektrophorese
RiboRuler RNA-Leiter-Mix (4 µl/Tasche), <i>high range</i>	Fermentas, St. Leon-Rot	RNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Leiter wurden stets in einem Verhältnis von DNA-Leiter zu 6x-Ladepuffer und Wasser von 1:1:4 angefertigt. Für den Einsatz der RNA-Leiter wurde diese zu gleichen Teilen aus RNA-Leiter und 2x-Ladepuffer gefertigt.

2.8 Lösungen und Puffer

Thermostabile, wässrige Lösungen wurden in einem Dampfdruckautoklaven vor Benutzung autoklaviert (121°C, 1 bar, 20 min) und anschließend bei RT gelagert. Die Anfertigung von Pufferlösungen erfolgte ausschließlich mit doppelt entionisiertem, filtriertem Wasser. Für RNA-Arbeiten wurde autoklaviertes, entionisiertes und mit DEPC behandeltes Wasser verwendet.

Lösungen für Agarosegelelektrophorese

Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese, 6x

30 % Glycerol
0,2 % Bromphenolblau
Lagerung bei -20°C

Tris-Acetat-EDTA-Puffer, TAE-Puffer, 50x

2 M Tris-Base
1 M Essigsäure
50 mM EDTA, pH 8,0

MOPS-Puffer, 10x (pH 7,0)

0,2 M MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA, pH 7,0

Laufpuffer für denaturierendes Agarosegel

1/10 Vol. 10x MOPS-Puffer
0,67 % Formaldehyd

Puffer für FLIPR-Experimente

C1-Puffer (pH 7,4)

130 mM NaCl
5 mM KCl
10 mM HEPES, pH 7,4
2 mM CaCl₂
10 mM Glucose

Lösungen für Stammzellkultur

2x Einfriermedium

80 % (v/v) fötales Kälberserum
20 % (v/v) DMSO

Lysispuffer für Stammzellen

10 mM Tris-HCl, pH 7,5
 10 mM EDTA
 10 mM NaCl
 0,5 % SDS
 0,125 U/ml Proteinase K (Roche)
 0,1 mg/ml RNase A

Lösungen für Arbeiten mit murinem Gewebe**Lysispuffer für Schwanzspitzen**

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
 100 mM EDTA
 100 mM NaCl
 1 % SDS

***Normal Tyrodes* (pH 7,2)**

135 mM NaCl
 5 mM KCl
 1 mM MgCl₂
 10 mM HEPES
 10 mM Glucose
 10 mM Natriumpyruvat

***Ca²⁺/Mg²⁺-freier Tyrodes* (pH 7,2)**

140 mM NaCl
 5 mM KCl
 10 mM HEPES
 10 mM Glucose
 10 mM Natriumpyruvat
 2 mM EGTA

Lösungen für Southern Blot**Denaturierungspuffer**

500 mM KOH
 1,5 M NaCl

Neutralisationspuffer

500 mM Tris-HCl, pH 7,5
 1,5 M NaCl

Prähybridisierungspuffer

1 % (v/v) Heringsperma-DNA, 10 g/l
 (5 min, 95°C denaturiert)
 10 % (w/v) Polyethylenglycol 6000
 7 % (w/v) SDS
 1,5x SSPE-Puffer

***Saline-sodium phosphate EDTA*, SSPE-Puffer, 20x (pH 7,4)**

3 M NaCl
 200 mM NaH₂PO₄·H₂O
 20 mM EDTA

***Saline-sodium citrate*, SSC-Puffer, 20x (pH 7,0)**

3 M NaCl
 0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat

Waschpuffer A

2x SSC-Puffer
 0,5 % SDS

Waschpuffer B

0,2x SSC-Puffer
 0,1 % SDS

Lösungen für In-situ-Hybridisierung**Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser**

0,1 % DEPC in H₂O
 3 x autoklavieren

4 %ige (w/v) Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (pH 7,4)

40 g/l Paraformaldehyd
 2 mM NaOH
 1 mM MgCl₂
 in 1x PBS

Phosphate-buffered saline, PBS-Puffer, 10x (pH 7,4)

0,8 M Na₂HPO₄

0,65 M NaCl

0,2 M NaH₂PO₄

Tris-buffered saline, TBS-Puffer, 10x (pH 7,4)

0,2 M Tris

1,5 M NaCl

Prähybridisierungspuffer

50 % (v/v) Formamid

5x Hybridisierungssalzlösung

5x Denhardts-Reagenz

0,2 % (w/v) SDS

250 µg/ml Hefe-tRNA

250 µg/ml Heringssperma-DNA

Lagerung bei -20°C

Hybridisierungspuffer

10 % (w/w) Dextransulfat

in Prähybridisierungslösung

50x Denhardts-Reagenz

1 % (w/v) Ficoll

1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon

1 % (w/v) Rinderserumalbumin

Lagerung bei -20°C

20x Hybridisierungssalzlösung (pH 6,8)

3 M NaCl

0,1 M PIPES

0,1 M EDTA

Saline-sodium citrate, SSC-Puffer, 20x (pH 7,0)

siehe Lösungen für *Southern Blot*

RNase-Puffer

0,5 M NaCl

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

1 mM EDTA, pH 7,5

1 µg/ml oder 2 µg/ml RNase A

Puffer 1 (pH 7,5)

150 mM NaCl

100 mM Maleinsäure

Puffer 2

1 % (w/v) Blockierungsreagenz
(Roche Diagnostics, Mannheim)
in Puffer 1

Lagerung bei -20°C

Puffer 3 (pH 9,5)

100 mM Tris-HCl

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

Farbsubstrat

0,25 mg/ml NBT-Lösung
(in Dimethylformamid)

0,175 mg/ml BCIP-Lösung
(in Dimethylformamid)

verdünnt in Puffer 3

Tris-EDTA-Puffer, TE-Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

1 mM EDTA, pH 8,0

Lösungen für Immunhistochemie

Phosphate-buffered saline, PBS-Puffer, 10x (pH 7,4)

0,2 M Na₂HPO₄

1,4 M NaCl

30 mM KCl

20 mM KH₂PO₄

Tris-NaCl-Tween-Puffer, TNT-Puffer

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

Tris-NaCl-Blocking-Puffer, TNB-Puffer

0,1 M Tris-HCl
 0,15 M NaCl
 0,5 % Blocking Reagenz (TSA-Kit)

Kultivierungspuffer, modifizierte Barth-Lösung nach Knox *et al.*, 1993 (pH 7,4)

87 mM NaCl
 2,4 mM NaHCO₃
 2 mM KCl
 1 mM MgCl₂
 0,7 mM Ca(NO₃)₂
 0,82 mM CaCl₂
 5 mM Tris-HCl

Puffer für Oozytenexperimente**Ca²⁺-freier KulORI**

90 mM NaCl
 1 mM KCl
 5 mM HEPES

Messpuffer, Ca²⁺-haltige Barth-Lösung nach Knox *et al.*, 1993 (pH 7,2)

87 mM NaCl
 2,4 mM NaHCO₃
 2 mM KCl
 1 mM MgCl₂
 28 mM CaCl₂
 5 mM Tris-HCl

2.9 Kulturmedien für Bakterien**LB-Agar** (pH 7,0) mit Antibiotikumzusatz

1,5 % (w/v) Agar
 1 % (w/v) Casein-Hydrolysat
 1 % (w/v) NaCl
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 autoklavieren

Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurde dem Agar je nach Bedarf 100 µg/ml Ampicillin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen), 100 µg/ml Kanamycin (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe) oder 20 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt. Nach Überführung des Mediums in 10 cm-Petrischalen und Abkühlung bei RT, erfolgte die weitere Lagerung bei 4°C.

LB-Medium (pH 7,0)

1 % (w/v) Casein-Hydrolysat
 1 % (w/v) NaCl
 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
 autoklavieren, Lagerung bei RT

SOC-Medium (pH 7,0)

- 2 % (w/v) g Casein-Hydrolysat
- 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
- 0,05 % (w/v) NaCl
- 2,5 mM KCl
- autoklavieren

Das SOC-Medium wurde abschließend 10 mM MgCl₂ (sterilfiltriert) und 20 mM Glucoselösung (sterilfiltriert) versetzt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.10 Bakterienstämme**Tab. 2.7. Bezugsquellen der verwendeten Bakterienstämme.**

Bakterienstamm	Hersteller
<i>E.coli</i> TOP10	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> DH5 α 10 ⁷	Bioline, Luckenwalde
<i>E.coli</i> DH5 α 10 ⁹	Bioline, Luckenwalde

2.11 Eukaryotische Zelllinien und Materialien für deren Kultivierung

Im Zuge von Zellkulturexperimenten mit eukaryotischen Zelllinien wurden HEK293T-Zellen, die stabil die G-Protein-Chimäre G α 16gust44 exprimierten, verwendet. Die HEK293T-Zellen wurden ursprünglich durch Jay Slack (Givaudan Flavors Corp., Cincinnati; OH, USA) modifiziert und zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). Diesem Medium wurde zusätzlich 10 % (v/v) hitzeinaktiviertes fötales Rinderserum, 2 mM Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin (siehe Auflistung) zugesetzt. Die stabile Expression der G-Protein-Chimäre G α 16gust44 wurde durch die Zugabe von 400 μ g/ml G418 sichergestellt.

Tab. 2.8. Bezugsquellen der verwendeten Kulturmaterialien für eukaryontische Zelllinien.

Kulturmaterial	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> mit 4,5 g/l Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
fötales Rinderserum	Biochrom AG, Berlin
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.12 Embryonale Stammzellen und Materialien für deren Kultivierung

In der ES-Zellkultur wurden embryonale Zellen der murinen Linie R1 129/Sv vom *Nagy Lab* (Toronto, CAN; Nagy *et al.*, 1993) genutzt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in 1x DMEM (mit Glucose, 25 mM Hepes, pyruvatfrei), zuzüglich 15 % fötales Kälberserum, 1x L-Glutamin (200 mM, 100x), 1x MEM NEAA (*non essential amino acids*, 100x), 1x Penicillin/Streptomycin (5000 IU Penicillin, 5000 µg Streptomycin/ml, 100x), 1x Nucleosidmix (100x), 1x Natriumpyruvat, 2x 2-Mercaptoethanol (1000x) und 1000 U/ml LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*).

Zur Anzucht der MEF-Zellen wurde DMEM (mit Glucose, 25 mM Hepes, pyruvatfrei) verwendet, welches mit 9 % fötalem Kälberserum, 1x MEM NEAA (100x) und 1x Penicillin/Streptomycin (5000 IU Penicillin, 5000 µg Streptomycin/ml, 100x) angereichert war.

Tab. 2.9. Bezugsquellen der verwendeten Kulturmaterialien für embryonale Stammzellen.

Kulturmaterial	Hersteller
DMEM (Glucose, pyruvatfrei, 25 mM Hepes)	Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (ES-qualified)	PAA Laboratories, Cölbe
L-Glutamin (200 mM, 100x)	Invitrogen, Karlsruhe
MEM NEAA (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (5000 IU Penicillin, 5000 µg Streptomycin/ml, 100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Nucleosidmix (100x)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Invitrogen, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol (1000x)	Invitrogen, Karlsruhe
LIF (10 ⁷ U/ml, Esgro)	Millipore, Schwalbach/Ts.

2.13 Versuchstiere

2.13.1 *Xenopus laevis*

Zur Prüfung der Eigenschaften von Opsinen wurden Oozyten des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* von Nasco (Nasco Biology Dept. Fort Atkinson; WI, USA) bezogen. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Weibchen, die in Becken mit 300 l Fassungsvermögen in Gruppen von 10 bis 20 Tieren gehalten wurden oder in der Anlage „XenopLus“ (Tecniplast, Hohenpleißenberg) mit permanentem Wasserzu- und Ablauf untergebracht waren. Die Haltung der Tiere erfolgte bei einer Wassertemperatur von 18°C mit regelmäßigen Überprüfungen der Wasserqualität (pH 7,2). Die Fütterung erfolgte mit einer speziell für den Krallenfrosch ausgerichteten Diät der Firma KLIBA NAFAG (Kaiseraugust, CH).

2.13.2 *Mus musculus*

In Zuge dieser Arbeit wurden Hausmäuse (*Mus musculus*) des Inzuchtstammes C57BL/6, die von Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, F) bezogen wurden, verwendet. Die Tiere erhielten *ad libitum* Standardfutter für Nagetiere der Firma Ssniff (V1534-0, Ssniff, Soest).

2.14 Geräte

Tab. 2.10. Verwendete Geräte und ihre Bezugsquellen.

Gerät	Hersteller
Analysenwaage Acculab Atilon	Sartorius AG, Göttingen
Binokular SZ-STU1	Olympus, Hamburg
<i>Crosslinker</i> Bio-Link BLX	Biometra, Göttingen
Dampfsterilisator (Dampfdruckautoklav)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Denley <i>Cellwash</i>	Labsystems, Frankfurt am Main
Economy-Heiz-Thermomixer MHR 11 HA04.1	Roth, Karlsruhe
Elektroporator Gene-Pulser	BIO-RAD Laboratories, München
Flockeneisbereiter AF-10	Scotsman, Mailand (I)
<i>Fluorometric imaging plate reader I</i>	Molecular Devices, München
<i>Freezer</i> minus86°C	Forma Scientific, San Bruno (USA)
Gelelektrophoreseapparatur Horizon 20.25	Biometra, Göttingen
Gelstand Horizon 58	Whatman Biometra GmbH
<i>GeneGenius Bio Imaging System</i> (Geldokumentation)	Syngene, Cambridge (UK)
Hybridisierungssofen PerfectBlot (ISH)	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
<i>Image Eraser</i>	Molecular Dynamics GmbH, Krefeld
Inkubator (für Zellkultur)	Heraeus, Hanau
Integrator F607-8184	Medical Agent, Kyoto (J)
Kapillarziehgerät; Model P-97	Sutter Instrument Co., Novato (USA)
Kühlschrank	Liebherr, Bulle (CH)
Konfokales Mikroskop, Leica TCS SP2	Leica Microsystems, Wetzlar
Kryostat HM 505 E, HM 560	Microm, Walldorf
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikroinjektor	Sutter Instrument Co., Novato (USA)
Mikroskop Axioplan	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen
Mikrowelle	Siemens, München
Mikrozentrifuge mit <i>butterfly</i> -Rotor	Roth, Karlsruhe
Mirax Scansystem	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen

Gerät	Hersteller
OpusXpress	Molecular Devices, München
pH-Meter Lab 850 Set	Schott Instruments, Mainz
<i>Power Pac 300</i> (Spannungsquelle für Elektrophorese)	BIO-RAD Laboratories, München
Rotationsofen/Hybridisierungssofen OV3	Biometra, Göttingen
Rotlichtquelle, Infraphil HP1511	Philips Lighting, Eindhoven (NL)
Rundschüttler TR-250	Infors HT, Einbach
Scanner Storm 820	GE Healthcare, Freiburg
Schüttler HS250	IKA Labortechnik, Staufen
Spectrophotometer Nanodrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Sterilisator	Memmert, Schwabach
Szintillationszähler LS 6000 LL	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Thermocycler TGradient	Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Tissue lyser II</i>	QIAGEN, Hilden
Transilluminator 4000	Stratagene, Amsterdam (NL)
UV-Lichtquelle, LED-UV-Auflicht	Volpi AG, Schlieren (CH)
UV-Lichtquelle, <i>filtered lamp for fluorescence</i> VL-6.MC	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vakuumpzentrifuge 5301	Eppendorf GmbH, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Waage AC 211S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad 1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Wasserreinigungssystem <i>ultra clear basic</i>	SG Wasseraufbearbeitung und Regenerierung GmbH, Barsbüttel
Weißlichtquelle, Intralux 4000-1	Volpi AG, Schlieren (CH)
Zentrifuge 5424	Eppendorf GmbH, Hamburg

2.15 Software

Tab. 2.11. Eingesetzte Software und ihre Bezugsquellen.

Software	Hersteller
AxioVision 4.7.2	Carl Zeiss, Göttingen
ChemWindow 3	CompuChem, Niederhall
Corel Draw	Corel Corporation, Ottawa (CAN)
Clamp fit 9.0	Molecular Devices, München
FLIPR ³⁸⁴	Molecular Devices, München
Geldokumentationssoftware GeneSnap	Syngene, Cambridge (UK)
Graph Pad Prism 4	Graph Pad Software, San Diego (USA)
LCS Leica Confocal Software	Leica Microsystems, Wetzlar
Meta Morph 7.1.3.0	Molecular Devices, München
Mirax <i>Viewer</i>	Carl Zeiss, Göttingen
Nanodropsoftware ND-1000 V3.3.0	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
OpusXpress 1.0	Molecular Devices, München
Scannersoftware Storm	GE Healthcare, Freiburg
SigmaPlot 11.0	SPSS Inc., (IBM, New York, USA)
SPSS 12.0	SPSS Inc., (IBM, New York, USA)
Vector NTI 9	Invitrogen, Karlsruhe

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) ist ein molekularbiologisches *In-vitro*-Verfahren zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Abschnitten, basierend auf der Matrizen-gesteuerten und Primer-abhängigen Replikation doppelsträngiger DNA. In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der PCR Fragmente für verschiedene Expressionsvektoren und Abschnitte der Zielvektoren zur Generierung der genetisch veränderten Mäuse gefertigt, sowie die Genotypisierung und Gewebecharakterisierung der Mäuse realisiert.

Die Amplifikation von spezifischen Nukleotidsequenzen erfolgte über den Einsatz von Desoxynukleotiden (dNTPs; 0,05 mM bis 1 mM), Vorwärts- (*forward*; for) und Rückwärtsprimern (*reverse*; rev; je 200 pM bis 300 pM), polymerasespezifischen Puffern, DNA-Polymerase, Amplifikationsmaterial (10 ng bis 100 ng) und Wasser (Ultra pure water, Biochrom AG, Berlin) in einem 0,2 ml-PCR-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg). Die Reaktionsansätze mit einem finalen Volumen von 25 µl (bei Nutzung von *Advantage Taq*- und Invitak-Polymerase) oder 50 µl (bei Einsatz von *PfuTurbo*-Polymerase) durchliefen spezifische Temperaturabfolgen und Synthesebedingungen in einem Thermocycler. Standardmäßig wurde in der vorliegenden Arbeit die *Advantage Taq*-Polymerase eingesetzt. Für die Generierung von Fragmenten, die für die Zielvektoren bestimmt waren, wurde hingegen die *PfuTurbo* genutzt. Deren 3'-5'-Exonuklease-Aktivität erlaubt die Korrektur falscher Basenpaarungen, wodurch unerwünschte Mutationen etwa 10-fach seltener auftreten. Die angereicherten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.2.1) überprüft.

Reaktionsansatz für <i>Advantage Taq</i>		Amplifikationsschritte		
Puffer	1x	5 - 10 min	95°C	} 35 bis 48 Zyklen
dNTPs	0,05 - 300 mM	1 min	95°C	
for Primer	200 - 300 pmol	1 min	55°C - 67°C	
rev Primer	200 - 300 pmol	1 min/1000 bp	68°C	
Polymerase-Mix	0,3 - 0,5 µl	10 min	68°C	
Wasser	ad 25 µl		4°C	

Reaktionsansatz für Invitek <i>Taq</i>		Amplifikationsschritte		
Puffer	1x	10 min	95°C	} 35 bis 40 Zyklen
dNTPs	0,25 mM	1 min	95°C	
for Primer	200 pmol	1 min	61°C - 65°C	
rev Primer	200 pmol	1 min/1000 bp	71°C	
MgCl ₂	1,5 mM	10 min	71°C	
Polymerase	5 U		4°C	
Wasser	ad 25 µl			

Reaktionsansatz für <i>Pfu</i> -Polymerase		Amplifikationsschritte		
Puffer	1x	2 min	95°C	} 48 Zyklen
dNTPs	1 mM	0,5 min	95°C	
for Primer	300 pmol	0,5 min	55°C - 67°C	
rev Primer	300 pmol	1 min/1000 bp	72°C	
Polymerase	2,5 U	10 min	72°C	
Wasser	ad 50 µl		4°C	

3.1.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, um DNA- und RNA-Fragmente (Nukleinsäuren) verschiedener Größen voneinander zu trennen, sowie DNA-Fragmente aufzureinigen.

3.1.2.1 Gele zur Trennung von DNA-Fragmenten

In Abhängigkeit von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 % bis 2 % (w/v) Agarose (*Ultra pure*, Invitrogen, Karlsruhe) in 1x-TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und 0,3 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Die zu separierenden Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und zur elektrophoretischen Auftrennung in die Taschen des Geles pipettiert. Der Auftrennungsprozess erfolgte je nach zu erwartender Fragmentgröße und Gelformat für 25 min bis 90 min in 1x-TAE-Puffer mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid. Für *Southern-Blot*-Analysen wurden hingegen 0,8 %ige Agarosegele mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid in 2x-TAE-Puffer verwendet. Die Elektrophorese erfolgte hier innerhalb von 3 h bis 5 h, bei 80 bis 110 V in 2x-TAE-Puffer ohne zusätzliches Ethidiumbromid.

3.1.2.2 Gele zur Trennung von RNA-Fragmenten

Für die Auftrennung von RNA-Fragmenten wurden denaturierende Agarosegele angefertigt. Hierfür wurden 1,2 % Agarose (w/v) in 1x-MOPS-Puffer gelöst und anschließend 0,67 % Formaldehyd hinzugefügt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 2x-RNA-Ladepuffer

(Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und für 10 min auf 65°C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde den Proben 1 µg Ethidiumbromid beigefügt. Die RNA-Proben wurden anschließend in 1x-MOPS-Puffer mit 0,74 % Formaldehyd für 30 min bis 60 min bei 70 V elektrophoretisch aufgetrennt.

3.1.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolation von DNA-Fragmenten wurden diese nach elektrophoretischer Auftrennung mit Hilfe eines Skalpellens aus dem Agarosegel isoliert und gemäß der Herstelleranleitung des *GFX PCR DNA and Gelband Purification*-Kits aufgereinigt. Abweichend hiervon erfolgte die Elution der DNA-Fragmente in 50°C warmem, deionisiertem Wasser.

3.1.4 Reinigung von DNA-Fragmenten mittels Glasfasersäule

In Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze binden DNA-Fragmente an Silikat-Material, die nach Entfernung unerwünschter Begleitkomponenten wie Pufferrückständen, Enzymen oder Nukleotiden mit Lösungen geringer Salzkonzentration (in diesem Fall Wasser) eluiert werden können. Die Aufreinigung von PCR-Ansätzen und Restriktionsverdau erfolgte unter Zuhilfenahme des *GFX PCR DNA and Gelband Purification*-Kits. Die Umsetzung erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichend von dessen Empfehlungen wurden zur Elution 35 µl bis 50 µl 50°C warmes Wasser herangezogen.

3.1.5 Mikrodialyse

Zur Entsalzung von Plasmidlösungen (u. a. nach Dephosphorylierungs- und Restriktionsreaktionen) wurde eine Petrischale mit entionisiertem Wasser gefüllt, ein Membranfilter (Porengröße 0,025 µm; Millipore, Schwalbach/Ts.) auf die Wasseroberfläche gelegt und die Plasmidlösung auf den Filter pipettiert. Nach 20 min wurde die nun salzärmere Plasmidlösung in ein Reaktionsgefäß überführt und nachfolgenden Reaktionsschritten zugeführt.

3.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Charakterisierung (analytischer Restriktionsverdau) und Klonierung (präparativer Restriktionsverdau) von DNA-Fragmenten und genomischer DNA wurden Enzyme von Fermentas und New England Biolabs in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem verwendet. Im analytischen Restriktionsverdau wurden 100 ng bis 300 ng DNA bei 37°C für 1 h bis 2 h inkubiert. Der präparative Restriktionsverdau mit 1 µg bis 10 µg Plasmid-DNA oder ES-Zell-DNA/genomischer DNA erfolgte über Nacht bei 37°C unter Einsatz von 10 U bis 50 U des Restriktionsenzym.

3.1.7 Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Um Religationen von Vektoren zu unterbinden, wurden unter Nutzung der alkalischen Phosphatase (*shrimp alkaline phosphatase*, SAP) 5'-terminale Phosphatgruppen von den Plasmid-Enden abgespalten. Hierfür wurden 100 ng bis 1 µg Plasmid-DNA und 1 U *rAPid Alkaline Phosphatase* aus dem *Rapid DNA Dephos and Ligation Kit* im entsprechenden Reaktionspuffer 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 72°C für 2 min hitzeinaktiviert und direkt zur Ligation eingesetzt. Im Zuge der Zielvektorgenerierung wurde die SAP von Roche verwendet. Die Inkubation des Enzyms mit der Plasmid-DNA erfolgte ebenfalls für 1 h, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65°C für 20 min und einer Entsalzung mittels Dialyse (siehe 3.1.5).

3.1.8 Auffüllen von 5'-Überhängen nach Restriktionsspaltung

Bei der Restriktionsspaltung von DNA werden in Abhängigkeit der Restriktionsendonukleasen zum Teil einzelsträngige Überhänge erzeugt, die bei der Ligation mit einem *blunt* (glatt) verdauten Vektor eine schlechte Ligationseffizienz bedingen. In einem solchen Falle wurde daher das überstehende Ende mit Hilfe des Klenow-Fragments zu glatten Enden modifiziert. Beim Klenow-Fragment handelt es sich um eine größere Untereinheit der DNA-Polymerase I des Bakteriums *E.coli*, die 5'-3'-Polymeraseaktivität und 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt. Zum Auffüllen der 5'-Überhänge wurden etwa 150 ng DNA, 5 U Klenow-Fragment und 62,5 µmol dNTPs in 1x-Klenow-Fragment-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 10 min wurde das Enzym hitzeinaktiviert (10 min bei 75°C) und konnte nach erfolgter Mikrodialyse (siehe 3.1.5) zur Ligation eingesetzt werden.

3.1.9 Phosphorylierung und Hybridisierung von DNA-Fragmenten

Um eine Steigerung der Ligationseffizienz zwischen dephosphorylierten Vektoren und Oligonukleotid-Fragmenten von Eurofins MWG Operon (Martinsried) zu erzielen, war vorab die Phosphorylierung und Hybridisierung dieser Fragmente notwendig. Zur Phosphorylierung wurde die T4-Polynukleotidkinase eingesetzt. Sie katalysiert die Übertragung des γ -Phosphats von ATP auf das 5'-Hydroxy-Ende eines Oligonukleotids. Hierfür wurden 300 pmol der einzelsträngigen Oligonukleotide mit 10 U T4-Polynukleotidkinase in 1x-Ligasepuffer mit ATP in einem 50 µl Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65°C über 20 min abgestoppt. Anschließend erfolgte die Hybridisierung zweier komplementärer Oligonukleotide. Zu diesem Zweck wurden 10 µl jedes Phosphorylierungsansatzes (60 pmol jedes Oligonukleotids) miteinander vermischt und auf 65°C erhitzt. Nach der initialen Denaturierung der intramolekularen Strukturen wurde die Temperatur alle 20 s um 1°C gesenkt, bis zum Erreichen von 25°C. Die so gewonnenen doppelsträngigen DNA-Fragmente konnten nachfolgend zur Ligation eingesetzt werden.

3.1.10 Ligation linearisierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten

3.1.10.1 Ligation mit T4-Ligase

Die Ligation von dephosphorylierten Vektoren (siehe 3.1.7) und linearisierten, über Agarosegelelektrophorese (siehe 3.1.3) oder Glasfasersäulen (siehe 3.1.4) aufgereinigten DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe des *rAPid DNA Dephos and Ligation Kit* umgesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei RT. Bei der Reaktion lagen Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:3 vor. Die Generierung von Plasmiden, mit einer Größe von mehr als 10 kb (Zielvektorgenerierung), erfolgte mit der T4-DNA-Ligase von New England Biolabs. Diese wurde über Nacht bei 16°C oder 4°C mit den Plasmidfragmenten inkubiert.

3.1.10.2 TOPO-TA/blunt-Klonierung

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in die pCR-2.1-TOPO- und pCR-Blunt II-TOPO-Vektoren wurde entsprechend der Informationen des Herstellers mit dem *TOPO-TA-Cloning Kit* bzw. dem *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* umgesetzt. Die Einbringung der generierten Konstrukte in kompetente *E.coli*-Zellen des Typs TOP10 erfolgte mittels Transformation (siehe 3.1.13).

3.1.11 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

DNA-Lösungen zur Isolation von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien und Zielvektorplasmide wurden zur Extraktion mit 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1; Roth, Karlsruhe) versetzt und durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min einer Phasentrennung unterzogen. Die DNA enthaltende, obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und im Falle der Zielvektorgenerierung erneut mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (CI, 24:1; Roth, Karlsruhe) extrahiert und anschließend gefällt. Bei der Isolation von genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen schloss sich an die PCI-Extraktion direkt die Fällung der DNA an.

3.1.12 Nukleinsäure-Fällung mit Ethanol

Nukleinsäurelösungen wurden unter Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und dem 2,5-fachen Volumen an 100 % Ethanol (-20°C) für 30 min bei -80°C gefällt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C) und das Pellet nach Entfernen des Überstandes mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser aufgenommen.

3.1.13 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Transformation ligierter DNA-Plasmide wurden kompetente *E.coli*-Bakterien (2.10) mit dem Ligationsansatz gemischt und nach 30 min auf Eis, einem Hitzeschock für 30 s (TOP10-Zellen) bzw. 45 s (Zellen von Bioline) bei 42°C unterzogen. Nach einer kurzen Abkühlungsphase auf Eis wurde den Zellen SOC-Medium zusetzt und für 45 min bis 60 min bei 37°C auf einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum (Ampicillin, 100 µg/ml; Kanamycin, 30 µg/ml;

Chloramphenicol, 30 µg/ml), entsprechend dem Selektionsmarker des Plasmids ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.1.14 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Die auf den LB-Agarplatten angewachsenen *E.coli*-Kolonien wurden nachfolgend in 2 ml (für analytischen Maßstab) bis 200 ml (für präparativen Maßstab) LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikazusatz über einen Zeitraum von 12 h bis 18 h bei 37°C und 200 rpm angezüchtet.

Die Gewinnung analytischer Mengen an Plasmid-DNA (1 µg bis 10 µg) erfolgte unter Einsatz des *NucleoSpin Plasmid Kits*, nach der Anleitung des Herstellers, mit Hilfe von Silikat-Säulen. Größere Mengen reiner Plasmid-DNA (50 µg bis 400 µg) wurden mit dem *NucleoBond PC Plasmid DNA Purification Kit* isoliert. Dabei wurde Plasmid-DNA mit Hilfe von Anionen-Austauscher-Harz auf Silikatbasis nach Herstellerangaben aufgereinigt.

3.1.15 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration und der Reinheitsgrad von Nukleinsäurelösungen wurde spektrophotometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Angabe von Konzentrationen ergab sich wie folgt:

$$\text{Konzentration } c \text{ [}\mu\text{g/ml]} = \text{Absorption}_{260\text{nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Absorptionskoeffizient.}$$

Der Absorptionskoeffizient doppelsträngiger DNA beträgt 50 ng/µl, der einzelsträngiger RNA 40 ng/µl. Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm – dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren – gab Aufschluss über Verunreinigungen mit Proteinen. Nahezu proteinfreie Nukleinsäurelösungen weisen idealerweise einen Quotienten $\text{Absorption}_{260\text{nm}}/\text{Absorption}_{280\text{nm}}$ von 1,8 bis bis 2,1 auf. Ein Quotient von < 1,7 kann als grobe Proteinverunreinigung gedeutet werden (Mülhardt, 2003).

3.1.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Martinsried). Entsprechend den Weisungen des Unternehmens wurden 1 µg DNA und 30 pmol Primer in einem Volumen von 15 µl der Firma zugesandt. Jedes Konstrukt wurde jeweils mit einem vorwärts- und einem rückwärtsgerichteten Primer sequenziert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit der Software ContigExpress des Vector NTI-Softwarepaketes.

3.2 Zellbiologische Arbeiten mit humanen Nierenzelllinien

3.2.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Für die zellbiologischen Arbeiten mit humanen Nierenzellen wurden HEK293T-Zellen, die stabil die G-Protein-Chimäre $G_{\alpha 16\text{gust}44}$ (2.11) exprimierten, verwendet. Die Zellen wurden auf Poly-D-Lysin-beschichteten (1 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin in Wasser, 30 min Inkubation) 10 cm-Schalen in serumhaltigem DMEM bei 37°C, 5 % CO_2 -Partialdruck und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Zum Passagieren der Zellen wurde das umgebende Medium vollständig abgenommen und die Zellen mit Trypsin (0,05 % (w/v) Trypsin; 0,5 mM EDTA in PBS) vom Boden gelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem DMEM abgestoppt. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen pelletiert (900 rpm, 5 min) und in frischem serumhaltigem DMEM resuspendiert. Abschließend wurde die Zellsuspension in einer geeigneten Verdünnung in neue Kulturschalen ausgesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von etwa 30 Passagen. Um neue Zellen in Kultur zu nehmen, wurden in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellaliquots im Wasserbad aufgetaut und in eine mit DMEM gefüllte Kulturschale überführt. Um tote Zellen und das in der Kryokonservierung notwendige DMSO (10 % DMSO in DMEM) aus dem Kulturmedium zu entfernen, wurde dieses nach 2 h bis 4 h nach Aussaat durch frisches, serumhaltiges Medium ausgetauscht. 24 h nach Auftauen der Zellen erfolgte die Kultivierung unter Antibiotikadruck. Neu aufgetaute HEK293T-Zellen wurden nicht vor der vierten Passage für Experimente herangezogen. Für *Calcium-Imaging*-Experimente erfolgte die Aussaat der Zellen in 96-Loch-Platten (μClear , Greiner, Solingen; beschichtet mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin). Für immunocytochemische Experimente wurden die HEK293T-Zellen auf Poly-D-Lysin-beschichtete Deckgläschen ($\varnothing 12$ mm, Roth, Karlsruhe), die vor der Beschichtung in Löcher einer 24-Loch-Platte überführt wurden, ausgesät.

3.2.2 Transiente Transfektion von HEK293T-Zellen

Ein (bei *Calcium-Imaging*-Experimenten) bis zwei Tage (bei immunocytochemischen Analysen) nach Zellaussaat erfolgte die Transfektion der HEK293T-Zellen. Diese wiesen zum Zeitpunkt der Transfektion eine Zelldichte von 60 % bis 70 % auf. Die transiente Transfektion erfolgte mittels Lipofektamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurde das Medium der Zellen gegen serumfreies DMEM ersetzt. Je nach Plattentyp wurde eine entsprechende Menge an DNA in serumfreiem Medium aufgenommen und Lipofektamin für 5 min in serumfreiem Medium gelöst. Die pro Loch eingesetzten DNA- und Lipofektamin-2000-Mengen sind in Tab. 3.1 aufgelistet. Die Sequenzen bzw. *Accession numbers* der analysierten Bitterrezeptoren sind dem Abschnitt 8.4.1 bzw. der Tab. 8.4 im Anhang zu entnehmen.

Tab. 3.1. Mengen und Volumen der für die transiente Transfektion verwendeten Materialien bei unterschiedlichen Plattenformaten. Angaben pro Loch.

Plattentyp	DNA [μg]	$V_{\text{DNA in DMEM}}$ [μl]	Lipofektamin 2000 [μl]	$V_{\text{Lipofektamin 2000}}$ in DMEM [μl]	$V_{\text{DMEM-Vorlage im}}$ Loch [μl]
96-Loch-Platte	0,15	12,5	0,3	12,5	50
24-Loch-Platte	0,75	25,0	1,5	25	500

Anschließend wurden die DNA- und Lipofektamin-2000-haltigen Medien gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Innerhalb dieser Zeit bildeten sich DNA-Lipofektamin-2000-Komplexe aus, die später von den Zellen aufgenommen werden konnten. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsgemisch etwa 3 h bis 5 h inkubiert, bevor das Transfektionsmedium gegen frisches, serumhaltiges DMEM ersetzt wurde. Etwa 24 h bis 26 h nach Beginn der Transfektion wurden die transient transfizierten Zellen den Experimenten zugeführt.

3.2.3 Nachweis der Expression transient transfizierter Bitterrezeptoren mittels Immuncytochemie

Auf Grund fehlender funktionierender Antikörper für Bitterrezeptoren war der direkte immunologische Nachweis von Tas2rs in transient transfizierten Zellen mit rezeptorspezifischen Antikörpern nicht möglich. Jedoch enthielten die hier zum Einsatz gekommenen Bitterrezeptorplasmide eine 30 bp lange C-terminale Sequenz, die für das Glycoprotein-D-Epitop des *Herpes simplex-Virus* kodiert. Die auf diese Weise markierten Bitterrezeptoren konnten über die kurze HSV-Peptidsequenz mit Hilfe eines kommerziellen Antikörpers indirekt nachgewiesen werden. Hierfür wurden wie in Abschnitt 3.2.1 geschildert, HEK293T-G α 16gust44-Zellen auf Poly-D-Lysin beschichtete Glasdeckplättchen in einer 24-Loch-Platte ausgesät und 48 h später transfiziert (siehe 3.2.2). Nach Verstreichen weiterer 24 h wurden das DMEM durch zweimaliges Waschen mit 37°C warmem PBS entfernt und die Zellen anschließend zur Unterbindung der Endozytose 30 min auf Eis mit 4°C kaltem PBS inkubiert. Die Färbung der Zellmembranen erfolgte mit Concanavalin A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; Sigma, Taufkirchen) in PBS für 1 h auf Eis. Überschüssiger Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen (jeweils für 1 min) mit 4°C kaltem PBS beseitigt und die Zellen durch eine Aceton-Methanol-Mischung (1:1; 2 min auf Eis) fixiert und permeabilisiert. Lösungsreste wurden erneut durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Um unspezifische Antikörperbindungen an den Zellmembranen zu unterbinden wurden die Zellen vor ihrer Inkubation (1 h bei RT) mit dem monoklonalen HSV-Tag-Antikörper in PBS mit 3 % Pferdeserum, für 30 min mit 3 % Pferdeserum in PBS blockiert. Nach wiederholtem dreimaligem Waschen (jeweils 5 min) mit PBS und erneuter Blockierung mit 3 % Pferdeserum in PBS, erfolgte die einstündige Inkubation mit den Sekundärantikörpern. Dabei handelte es sich um ein Streptavidin-gekoppeltes Alexa-Fluor-633-Peptid (Detektion von Concanavalin A) und einen gegen die Maus gerichteten Alexa-Fluor-488-Antikörper (Sekundärantikörper zur HSV-Visualisierung). Unspezifisch gebundene Antikörper wurden

mittels dreimaligem Waschen für 10 min eliminiert und die Präparate durch ein erneutes Waschen mit Wasser entsalzt. Die Glasdeckplättchen wurden mit der Oberseite nach unten auf einen Objektträger mit Einbettmedium (*Fluorescent Mounting Medium*, Dako, Hamburg) überführt und die Präparate nach Aushärtung am Konfokalmikroskop (siehe 3.5.7) analysiert und digitalisiert.

3.2.4 Funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren

3.2.4.1 Grundlage von *Calcium-Imaging*-Experimenten

Zur funktionellen Analyse von heterolog exprimierten Rezeptoren wurde ein auf dem Ca^{2+} -Status von Zellen und Geweben basierendes Reportersystem, das *Calcium Imaging*, angewandt. Dieses nutzt die Eigenschaft von Bitterrezeptoren über koexprimierte G-Proteine den PLC-Signalweg zu verwenden. Für die Aktivierung von PLC sind G-Proteinuntereinheiten des Typs $\text{G}\alpha_q$ vonnöten, deren C-Termini mit den Geschmacksrezeptoren interagieren (Conklin *et al.*, 1993; Lichtarge *et al.*, 1996). In diesem Fall kam, nach Vorbild von Ueda *et al.* (2003) die G-Protein-Chimäre $\text{G}\alpha_{16\text{gust44}}$, bei der die 44 C-terminalen Aminosäuren des $\text{G}\alpha_{16}$ durch die des Gustducins ($\text{G}\alpha_q$ -Subtyp) ersetzt wurden und die von den HEK293T-Zellen stabil exprimiert wird, zum Einsatz. Diese C-terminalen Aminosäuren des Gustducins beinhalten die spezifische Bindungsdomäne des G-Proteins, mit der die Kopplung der Gustducin- $\text{G}\alpha$ -Untereinheit an die Bitterrezeptoren in Geschmacksrezeptorzellen erfolgt (McLaughlin *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 2003). Somit führt eine Rezeptoraktivierung durch die Wechselwirkung mit der G-Protein-Chimäre zu einem IP_3 -vermittelten Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dieser kann mit Hilfe von Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen, die durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen ihre Fluoreszenzeigenschaften verändern, fluometrisch erfasst werden. Die Wirkungsweise dieser Ca^{2+} -Indikatoren beruht auf den Eigenschaften von BAPTA (1,2-Bis(O-Aminophenoxy)Ethanol-N,N,N',N'-Tetraessigsäure), zweiwertige Ionen durch seine Carboxylgruppen zu chelatieren. Die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an den Ca^{2+} -Indikator, hier Fluo4 (Invitrogen, Karlsruhe), bewirkt eine Steigerung seiner Fluoreszenz-Intensität ohne Spektralverschiebung. Fluo4 wird als Acetoxymethylester (AM) genutzt, in dem die Carboxylgruppen maskiert vorliegen, damit die Membrangängigkeit des Farbstoffes gewährleistet werden kann. Von der Zelle aufgenommen, führt die Aktivität von endogenen unspezifischen Esterasen zur Abspaltung des Esters. Der Ca^{2+} -Indikator liegt nun funktionstüchtig in der Zelle vor und kann diese auf Grund seiner Ladung nicht mehr verlassen.

Für die funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren in HEK293T- $\text{G}\alpha_{16\text{gust44}}$ -Zellen wurden diese nach Beladung mit dem Ca^{2+} -Indikator Fluo4 mit Testsubstanzen stimuliert. Die Reaktion der Zellen auf die Applikation wurde fluometrisch am Fluoreszenz-Plattenlesegerät erfasst. Das Prinzip der funktionellen Analyse von HEK293T- $\text{G}\alpha_{16\text{gust44}}$ -Zellen in *Calcium-Imaging*-Experimenten ist in Abb. 3.1 schematisch dargestellt.

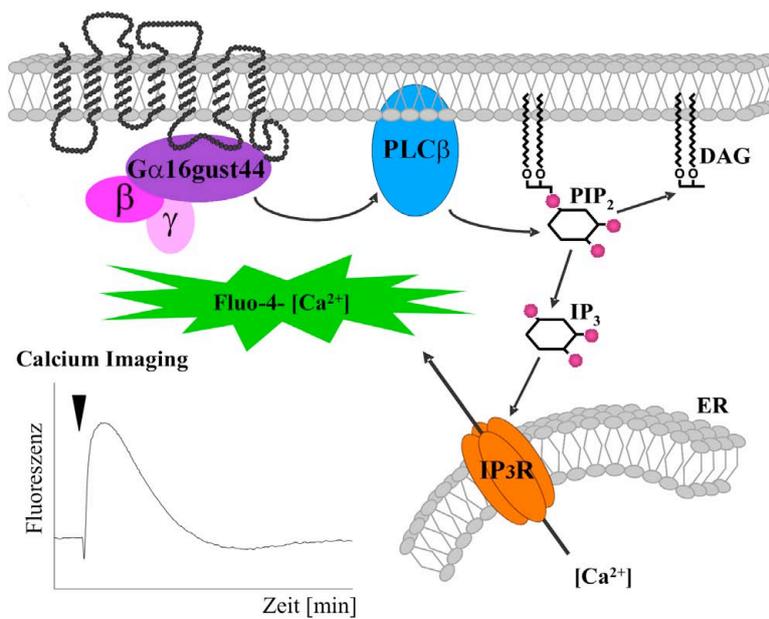


Abb. 3.1. Prinzip von Calcium-Imaging-Experimenten in HEK293T-Zellen. Die Bindung von Liganden an heterolog exprimierte Bitterrezeptoren in HEK293T-Gα16gust44-Zellen führt zur Aktivierung von G-Proteinen, in dessen Folge die G-Protein-α-Untereinheit Gα16gust44 die membranständige Phospholipase Cβ (PLCβ) stimuliert. PLCβ katalysiert die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG). IP₃ bedingt durch die Bindung an IP₃-Rezeptoren (IP₃R) des endoplasmatischen Retikulums (ER)

die Freisetzung von Calcium-Ionen aus diesem. Bedingt durch die Beladung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo4 führt der transiente Anstieg der cytosolischen Calcium-Ionen-Konzentration zu einem proportionalen Fluoreszenzsignal. (Bild: Dr. Anne Brockhoff)

3.2.4.2 Calcium-Imaging-Experimente im Fluoreszenz-Plattenlesegerät

Zwei Tage nach Aussaat der Zellen (siehe 3.2.1) auf schwarzwandige 96-Loch-Platten mit klarem Boden und 22 h bis 24 h nach Transfektion der HEK293T-Gα16gust44-Zellen (siehe 3.2.2) wurden die Calcium-Imaging-Experimente im FLIPR (*Fluorometric imaging plate reader*) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen 60 min mit dem Ca²⁺-Indikator Fluo4-AM in einer Mischung aus 2 μM Fluo4-AM und 2,5 mM Probenecid (Sigma, Taufkirchen) in serumfreiem Medium in einem Volumen von 50 μl inkubiert und beladen. Der überschüssige und unspezifisch gebundene Farbstoff wurde durch dreimaliges Waschen im automatischen Plattenwaschgerät im Abstand von etwa 20 min bis 30 min mit C1-Puffer entfernt. Zwischen diesen Waschschrritten erfolgte die Inkubation der Zellen bei RT unter Ausschluss von Licht. Nach Verstreichen der C1-Puffer-Inkubation sollte der Farbstoff vollständig einer sauren Esterhydrolyse unterzogen worden sein. Nach dem Waschen verblieben jeweils 100 μl C1-Puffer im Loch. Direkt im Anschluss an den letzten Waschschriff schloss sich die Messung im FLIPR (mit Belichtungszeiten von 0,2 s bis 0,4 s, Laserleistung von 0,5 W bis 0,7 W und dem Lasermodus *constant light*) mit folgendem Protokoll an:

Messprotokoll:

1 min	10 Messungen	6 s Intervall
Applikation 1 (Testlösung), nach 10 Messungen, zweifach konzentriert, 100 μl Volumen		
2 min	60 Messungen	2 s Intervall
6 min	60 Messungen	6 s Intervall
Applikation 2 (Somatostatin 14), nach 130 Messungen, fünffach konzentriert, 50 μl Volumen		
2 min	60 Messungen	2 s Intervall
1 min	10 Messungen	6 s Intervall

Im FLIPR kann der Fluoreszenzfarbstoff durch einen Argon-Laser mit Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt und mittels einer CCD-Kamera mit einem geeigneten Filtersatz die Emission bei 510 nm simultan detektiert werden. Um den optimalen Messbereich des FLIPRs zu nutzen, wurde vor Beginn des Experimentes die Hintergrundfluoreszenz der Messplatte durch Veränderung der Laserleistung oder der Belichtungszeit auf etwa 10000 bis 12000 relative Lichteinheiten angepasst. Das Auftreten dieses Hintergrundes ist der Grundfluoreszenz des Farbstoffes geschuldet und daher abhängig von Anzahl und Beladungszustand der Zellen. Die Applikation der Liganden erfolgte mit Hilfe eines in den FLIPR integrierten 96-Loch-Pipettors mit 25 μ l/s. Bei der ersten Ligandenapplikation wurde die zu untersuchende Testsubstanz in einem Volumen von 100 μ l zu den Zellen gegeben und durch die nach dem Waschen verbliebene C1-Lösung auf ihre finale Testkonzentration verdünnt. Im Zuge der zweiten Applikation wurden 100 nM (Endkonzentration) Somatostatin 14 (SST-14; Bachem, Weil am Rhein) auf die Zellen pipettiert, welches die endogen exprimierten Somatostatin-Rezeptoren des Subtyps 2 (SSTR2; Law *et al.*, 1993; Kagimoto *et al.*, 1994) der HEK293T-Zellen aktiviert. Die Zweitapplikation dient der Überprüfung der Zellvitalität und gibt Aufschluss über Anzahl und Beladungszustand vitaler Zellen im Messfenster. Für die Identifizierung Rezeptor-spezifischer Signale wurden auch mit dem Leervektor transfizierte Zellen mit den Testsubstanzen stimuliert. Weiterhin wurde Zellen, die mit den Rezeptorplasmiden transfiziert wurden, das Lösungsmittel C1-Puffer appliziert. Bei Anstieg des Fluoreszenzniveaus nach Applikation der Testsubstanz auf den mit Leervektoren transfizierten Zellen wurde dies als artifizielles und rezeptorunabhängiges Signal gewertet und diese Substanzverdünnung bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Ursache für solch rezeptorunabhängige Reaktionen auf die verschiedenen Testsubstanzen können osmotische Effekte oder die Aktivierung endogener Rezeptoren oder Ionenkanäle sowie cytotoxische Effekte sein. Die Konzentrationen der verschiedenen Testsubstanzen, die hier zur Anwendungen kamen, sind daher sowohl von der Löslichkeit der Testsubstanz als auch von ihrer Wirkung auf HEK293T-G α 16gust44-Zellen bestimmt. Die Messungen wurden stets im Triplikaten durchgeführt und in zwei unabhängigen Experimenten überprüft.

3.2.4.3 Auswertung von *Calcium-Imaging*-Experimenten

Die Auswertung der *Calcium-Imaging*-Messdaten erfolgte mit Hilfe der FLIPR³⁸⁴-Software und SigmaPlot 2000. Zur Identifikation eines Signals wurden die erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich Rezeptorabhängigkeit und Substanzabhängigkeit überprüft. Für ersteres wurde das erhaltene Signal von Zellen, die mit dem Rezeptorplasmid transfiziert wurden, mit dem Verhalten von Zellen, die nur mit der Vektor-DNA (Leervektor) transfiziert wurden, verglichen. Die Substanzabhängigkeit wurde durch die Prüfung der Tas2r-transfizierten Zellen bei Applikation von Lösungsmittel allein sichergestellt.

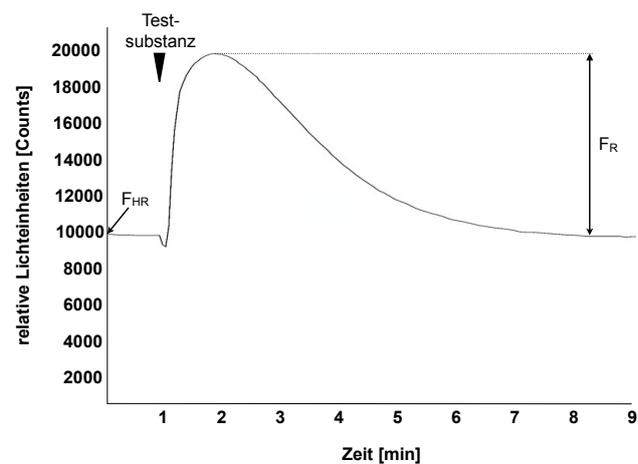
Für die Kalkulation von Dosis-Wirkungskurven wurden die Fluoreszenzsignale (Differenz zwischen maximaler und minimaler Fluoreszenzintensität) der mit den Rezeptorplasmiden transfizierten Zellen um die Fluoreszenzänderung von mit Leervektor transfizierten Zellen, die mit der gleichen Testlösung stimuliert wurden, verringert und die gewonnenen Daten aus der FLIPR³⁸⁴-Software exportiert. Um Unterschiede durch Schwankungen wie Zellzahl, Vitalität und

Beladungszustand der Zellen auszugleichen, wurden die erhaltenen Fluoreszenzwerte nach Ligandenapplikation auf die Basisfluoreszenzwerte normiert und dieser Quotient um den Quotienten C1-Puffer applizierter, Rezeptor-transfizierter Zellen reduziert.

$$\Delta F/F = (F_R/F_{HR}) - (F_{R\ C1}/F_{HR\ C1})$$

F_R ist dabei das maximale Fluoreszenzsignal, der mit Rezeptorplasmiden transfizierten Zellen nach Testsubstanzapplikation, F_{HR} die Hintergrundfluoreszenz der Rezeptor-transfizierten Zellen, $F_{R\ C1}$ das maximale Fluoreszenzsignal Rezeptor-transfizierter Zellen nach C1-Applikation, $F_{HR\ C1}$ die Hintergrundfluoreszenz der Zellen, die mit Rezeptorplasmiden transfiziert wurden, vor C1-Applikation (Abb. 3.2).

Abb. 3.2. Faktoren für die Berechnung des Fluoreszenzsignals $\Delta F/F$ in Rezeptor-transfizierten Zellen.
 F_{HR} =Hintergrundfluoreszenz Rezeptor-transfizierter Zellen, F_R =absolutes maximales Fluoreszenzsignal Rezeptor-transfizierter Zellen nach Testsubstanzapplikation.



Anschließend wurde mittels der nicht-linearen Regressionsfunktion der EC_{50} -Wert kalkuliert.

$$f(x) = (a-d)/[1+(x/C)^{nh}] + d$$

Hierbei ist a das Maximum, d das Minimum, C der EC_{50} -Wert und nh der Hill-Koeffizient. Die Kalkulation des EC_{50} -Wertes erfolgte in der vorliegenden Arbeit nur für ausgewählte Rezeptoren und Substanzen, da hohe Testsubstanzkonzentrationen im Zellsystem oftmals in Artefakten mündeten, wie sie durch Aktivierung zellulärer Strukturen oder Veränderungen der Plasmamembran hervorgerufen werden. Für die Dosis-Wirkungskurven wurden die Fluoreszenzsignale mit Standardabweichung gegen den Logarithmus der Testsubstanzkonzentration dargestellt.

3.3 Zellbiologische Arbeiten mit embryonalen Stammzellen

3.3.1 Kultivierung von Stammzellen

Für die Generierung der *Knockout*-Mäuse wurden R1-ES-Zellen verwendet. Die Kultivierung der ES-Zellen erfolgte auf gelatinisierten 10 cm-Schalen und 96-Loch-Platten mit mitotisch inaktivierten embryonalen Maus-Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblast*, MEF). MEF-Zellen tragen zur Unterbindung spontaner Differenzierungen bei und wurden von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer (ZMNH, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Um einerseits die Pluripotenz der ES-Zellen aufrechtzuerhalten und andererseits eine optimale Kultivierung der ES-Zellen zu gewährleisten, wurden diese mit einem um den LIF-Wachstumsfaktor ergänzten ES-Zellmedium kultiviert (Pease & Williams, 1990). Zur Generierung von rekombinanten ES-Zellen wurde ein

linearisierter Zielvektor über Elektroporation in die ES-Zellen der Maus eingebracht. Die zeitliche Abfolge der ES-Zellkultur ist in Abb. 3.3 schematisch dargestellt.

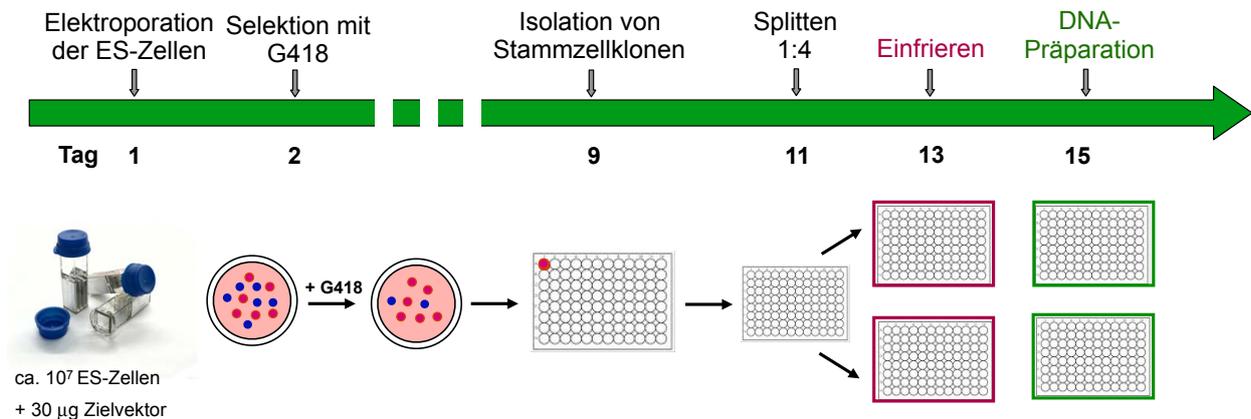


Abb. 3.3. Schematischer Ablauf der embryonalen Stammzellkultur. Der linearisierte und aufgereinigte Zielvektor wurde über Elektroporation in R1-ES-Zellen eingebracht und die ES-Zellen auf 10 cm-Schalen ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen für eine Woche unter Selektionsdruck kultiviert. Das Antibiotikum Geneticin (G418) führte zum Absterben der ES-Zellen, die den Zielvektor nicht aufgenommen hatten (positive Selektion), während ES-Zellen mit dem eingebauten DNA-Fragment überlebten und Kolonien bildeten. Diese wurden anschließend nach Vereinzeln in Löcher einer 96-Loch-Platte überführt und kultiviert. Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurden die Zellen 1:4 gesplittet. Die Hälfte der Platten wurde nach zwei Tagen eingefroren (rot). Die verbliebenen zwei Platten wurden zur Gewinnung von ES-Zell-DNA eingesetzt (grün). Hierfür wurden die Zellen vier Tage nach Aussaat lysiert und einer Southern-Blot-Analyse unterzogen.

3.3.2 Elektroporation von Stammzellen

Zur Einbringung der Zielvektoren in die ES-Zellen der Maus wurden diese zuvor linearisiert und mittels PCI-Extraktion (siehe 3.1.11) mit anschließender Ethanol-fällung (siehe 3.1.12) aufgereinigt und konzentriert. Für die anschließende Elektroporation wurden 10⁷ ES-Zellen einmal mit PBS/EDTA gewaschen, durch Inkubation (4 min bei 37°C) mit 0,25 % Trypsin/EDTA vereinzelt und in 10 ml Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation wurde das erhaltene ES-Zell-Pellet mit 10 ml PBS gewaschen und in 800 µl PBS aufgenommen.

Die ES-Zellen wurden zusammen mit 30 µg der aufgereinigten und linearisierten Zielvektor-DNA in eine Elektroporationsküvette (0,4 cm; BioRad Laboratories, München) überführt. Die Suspension von Zellen und DNA wurde einem elektrischen Puls mit hoher Spannung unterworfen (Aufladespannung des Kondensators von 250 V und 500 µF Kapazität). Anschließend verblieben die Zell-DNA-Suspensionen für 10 min bei RT, bevor sie in einer 5 cm-Kulturschale mit MEF-Zellen ausgesät wurden.

3.3.3 Selektion von Stammzellen mit Geneticin

Ein Tag nach Elektroporation wurden die ES-Zellen für eine Woche unter Selektionsdruck kultiviert. Hierfür enthielt das Medium 150 µg/ml bis 250 µg/ml Geneticin (G418; Merck, Darmstadt) und wurde täglich gewechselt.

3.3.4 Vereinzeln von Stammzellklonen

Nach einwöchiger Selektion wurden individuelle Kolonien in 96-Loch-Platten überführt. Zu diesem Zweck wurden die 10 cm-Kulturschalen zweimal mit 1x PBS gewaschen und Kolonien mit guter Morphologie, das heißt runde, scharf abgegrenzte, weiße Kolonien, ausgewählt und unter einem Binokularmikroskop manuell in eine Pipettenspitze eingesaugt. Jeder Klon wurde in ein Loch einer 96-Loch-Platte überführt und dort nach 4 min Inkubation in 0,25 % Trypsin/EDTA bei 37°C und anschließendem Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die vereinzelteten ES-Zellen wurden auf mit MEF-Zellen beschichtete 96-Loch-Platten in ES-Medium ausgesät und kultiviert.

3.3.5 Splitten von vereinzelteten Stammzellklonen

48 h nach Vereinzeln der Stammzellklone wurden diese in einem Verhältnis von 1:4 gesplittet. Hierfür wurden die ES-Zellen in der 96-Loch-Platte mit PBS/EDTA (0,2 g/l EDTA) gewaschen und mit 0,25 % Trypsin/EDTA für 4 min bei 37°C inkubiert. Durch Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen vereinzelt und die Trypsinreaktion durch Zugabe des 4-fachen Volumens an ES-Zellmedium gestoppt. Das Suspensionsvolumen wurde nachfolgend zu gleichen Anteilen auf vier gelatinisierte 96-Loch-Platten verteilt, von denen zwei mit MEF-Zellen bewachsen waren. Die mit MEF-Zellen bewachsenen Platten wurden 48 h später eingefroren und zur Injektion positiv identifizierter Klone herangezogen, während die anderen für die Isolation der DNA und Analyse der homologen Rekombination (*Southern Blot*) genutzt wurden. Bis zum Einfrieren erfolgte der Mediumwechsel weiterhin täglich für die auf MEF-Zellen gehaltenen Stammzellen, während die Stammzellen für die DNA-Isolierung nur noch alle zwei Tage neues Medium erhielten.

3.3.6 Einfrieren von Stammzellklonen

Die zwei gelatinisierten, mit MEF-Zellen-beschichteten 96-Loch-Platten mit ES-Zellen wurden zumeist zwei Tage nach dem Splitten eingefroren. Hierfür wurde zu Beginn das Medium der ES-Zellen durch frisches ersetzt. Zwei Stunden später wurden die ES-Zellklone gewaschen (mit PBS und 0,2 g/l EDTA), mit Trypsin/EDTA für 4 min bei 37°C inkubiert und durch mechanische Bewegungen vereinzelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl ES-Zellmedium abgestoppt. Anschließend wurden die 96-Loch-Platten auf Eis gehalten und das gleiche Volumen an 2x Einfriermedium pro Loch beigelegt und mit dem Medium gemischt. Unmittelbar im Anschluss wurden die Platten in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Hier verblieben die Zellen bis zur Identifikation eines erfolgreich modifizierten Stammzellklones und deren Expansion.

3.4 Arbeiten mit embryonaler Stammzell-DNA

3.4.1 Isolation und Fällung genomischer DNA aus Stammzellen

Um die genomische DNA der ES-Zellen zu gewinnen, wurden diese auf einer 96-Loch-Platte bis zu kompletter Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen. Es folgte die Lyse der Zellen in 100 µl Lysispuffer für Stammzellen pro Loch in einer feuchten Kammer bei 55°C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die DNA durch die Zugabe von 100 µl Isopropanol und 10 µl 8 M LiCl über 5 h bis 8 h bei 4°C oder über Nacht bei RT gefällt. Die sedimentierte DNA wurde für 30 min bei 3500 rpm (bei RT) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer Lufttrocknung, die niemals den Zeitraum von 30 min überschritt, wurde das Pellet in einem 35 µl Restriktionsmix, bestehend aus Restriktionsendonuklease (3 U), RNase A (1,8 mg/ml), Restriktionspuffer und Wasser, über Nacht bei 37°C gelöst und verdaut.

3.4.2 Southern Blot

Der Nachweis einer spezifischen Gensequenz in einem komplexen DNA-Gemisch (Genom der Stammzellen oder Maus) erfolgte mittels *Southern Blot*. Hierfür wurde die DNA nach Behandlung mit Restriktionsenzymen durch Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran transferiert und anschließend die spezifische Gensequenz radioaktiv durch eine komplementäre DNA-Sonde nachgewiesen.

3.4.2.1 Transfer von DNA auf Nylon⁺-Membranen

Die, wie in 3.4.1 beschrieben, präparierte Stammzell-DNA wurde zusammen mit einem Molekulargewichtsmarker (1 kb-DNA-Leiter) auf ein Agarosegel (0,8 %, 2x TAE) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Der Auftrennung folgte eine Depurinierung durch eine zehnmünütige Inkubation des Agarosegels in einer 0,25 M HCl-Lösung und eine Spaltung der DNA in ihre Einzelstränge durch eine Denaturierung über 45 min im Denaturierungspuffer. Nach einer kurzen Spülung des Agarosegels in Wasser wurde es über einen Zeitraum von 30 min im Neutralisierungspuffer neutralisiert. Der Transfer und die dauerhafte Fixierung der DNA auf eine Nylon⁺-Membran (GE Healthcare, Freiburg) erfolgte mittels Kapillar-Blot. Hierfür lief ausgehend von einem Reservoir 20x-SSC-Puffer durch das Gel, durch die Nylon-Membran zu einem Stapel saugfähigen Materials. Der entstandene Flüssigkeitsstrom zog die DNA aus dem Gel in die Nylon-Membran. Das Verfahren dauerte etwa 40 h. Anschließend wurde die Membran, zur weiteren Fixierung der DNA an dieser, für 1 min im *Crosslinker* mit UV-Licht bestrahlt.

3.4.2.2 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Generierung der DNA-Sonden erfolgte nach der *Random-Primer-Labeling-Methode* (Feinberg & Vogelstein, 1983) unter Zuhilfenahme des *Megaprime DNA Labeling System, dCTP-Kits* von GE Healthcare. Hierfür wurden etwa 40 ng der zu markierenden Sonde (von etwa 480 bp bis 1100 bp Länge) zu 5 µl Hexanukleotiden (*Random Primern*) in einem finalen

Volumen von 33 µl gegeben. Um die Einzelsträngigkeit der DNA zu gewährleisten, wurde diese für 5 min auf 95°C erhitzt und anschließend mit dem Reaktionspuffer inklusive Nukleotide, 50 µCi [α - ^{32}P]-2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (α - ^{32}P -dCTPs) und 2 U *DNA polymerase Klenow-Fragment* vermengt. Während der einstündigen Synthese bei 37°C werden radioaktive Phosphorisotope ^{32}P in die DNA eingebaut. Um freie Nukleotide aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurden die Sonden anschließend mittels Glasfasersäule (siehe 3.1.5) aufgereinigt. Hierfür wurden abweichend vom Hersteller 400 µl DNA-Bindepuffer eingesetzt. Auch wurde die markierte Sonde in 100 µl Wasser eluiert. Vor und nach der Aufreinigung wurden den Reaktionsansätzen jeweils 1 µl Probe entnommen und mit 3 ml Szintillationslösung (GE Healthcare, Freiburg) vermengt. Die Radioaktivität, die mittels Szintillationszähler in Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) erfasst wurde, wurde zur Bestimmung der Gesamtmenge an eingebauten radioaktiven Nukleotiden in der aufgereinigten Probe und der Einbaurrate herangezogen.

Gesamtmenge an eingebauten radioaktiven Nukleotiden = $\text{cpm}_{(\text{nach Aufreinigung})} \cdot \text{Volumen (100 } \mu\text{l)}$

Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität in der Probe = $\text{cpm}_{(\text{vor Aufreinigung})} \cdot \text{Volumen (50 } \mu\text{l)}$

Einbaurrate in % = $\frac{\text{Gesamtmenge an eingebauten radioaktiven Nukleotiden in der Probe} \cdot 100}{\text{Gesamtmenge an Radioaktivität in der Probe}}$

3.4.2.3 Hybridisierung von Nylon⁺-Membranen mit radioaktiven DNA-Sonden

Um die freien Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde diese vor der Hybridisierung mit 30 ml Prähybridisierungslösung für 30 min bis 60 min bei 63°C in einer Hybridisierungsröhre (Biometra, Göttingen) im Rotationsofen inkubiert.

Für die Hybridisierung der Membran wurde die Sonde zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA direkt vor der Verwendung auf 95°C erhitzt und anschließend mit Prähybridisierungslösung vermischt (Hybridisierlösung). Die 2 Mio cpm/ml enthaltende Hybridisierlösung wurde über Nacht zur Hybridisierung der Membran bei 63°C im Rotationsofen inkubiert. Die hohe Temperatur sollte sicherstellen, dass die Sonde nur an ihre Zielsequenz bindet und keine unspezifischen Wechselwirkungen mit anderen Sequenzabschnitten eingeht. Am nächsten Morgen wurden die Membranen mit Salzlösungen (Waschpuffer A, bei starker Hintergrundradioaktivität mit Waschpuffer B) für 30 min bis 60 min bei 63°C gewaschen, um ungebundene Sondenteile zu entfernen. Anschließend wurden die Membranen in Klarsichtfolie (Seran-Film; Roth, Karlsruhe) feucht eingepackt und für zirka 24 h auf einem Phosphorimager-Schirm (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) exponiert. Die ausgesandten Betastrahlen führten zur Veränderung der Beschichtung (mit Europium-dotierten Bafluorobromid-Kristallen) der Phosphorimager-Schirme, die mit Hilfe des Scanners Strom 820 und der dazugehörigen Software ausgelesen werden konnte.

3.5 Arbeiten mit Mäusen und murinem Gewebe

3.5.1 Haltungs- und Zuchtbedingungen

Die hier verwendeten Tiere wurden gemäß der Richtlinien zur Tierhaltung und des Tierschutzgesetzes in den Räumlichkeiten des Max-Rubner-Laboratoriums unseres Institutes bzw. in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten und gezüchtet. Die Mäuse wurden nach Geschlecht getrennt mit ihren jeweiligen Wurfgeschwistern in Käfigen mit Einstreu bei einer RT von 22°C und einem Tag-Nacht-Zyklus mit 12 h Licht (von 6 bis 18 Uhr) aufgezogen. Während dieser Zeit hatten die Tiere uneingeschränkten (*ad libitum*) Zugang zu Nahrung und Wasser. Die vorgenommenen Versuche und Analysen wurden durch das Landesamt für Verbraucherschutz, Landwirtschaft und Flurerneuerung in Frankfurt/Oder (Tierschutzgenehmigung: 23-2347-A-1-2-2010) bzw. durch die Behörde für Wissenschaft und Gesundheit, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen in Hamburg (Tierschutzgenehmigung: G21305/591-00.33) genehmigt.

Die chimären Böcke der generierten Mausmodelle wurden mit C57BL/6-Mäusen verpaart. Heterozygote Nachkommen aus diesen Verpaarungen wurden für die ersten Analysen und zur Erhaltung der Linien eingesetzt. Die Geschmacksrezeptor-*Knockout*-Mäuse bekamen abweichend vom C57BL/6-Stamm (siehe 2.13.2) eine Diät, die zusätzlich mit Vitamin A angereichert war (V1534-3, Ssniff, Soest).

3.5.2 Gewinnung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien der Maus

Zur Identifizierung des Genotyps einer Maus wurde genomische DNA aus der Schwanzspitze jedes Tieres isoliert. Hierfür wurden die Biopsien in 500 µl Lysispuffer mit 50 µg/ml Proteinase K (Roth, Karlsruhe) bei 55°C und 300 rpm über Nacht lysiert. Nach vollständiger Lyse des Gewebes wurde die DNA mittel Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (siehe 3.1.11) isoliert und das DNA-Pellet in 80 µl Wasser aufgenommen. 1,5 µl einer 1:10-Verdünnung dieser DNA-Lösungen wurde später für die Genotypisierung-PCR und 37 µl (unverdünnt) für eine *Southern-Blot*-Analyse eingesetzt.

3.5.3 Perfusion und Gewebepräparation

3.5.3.1 Kardiale Perfusion

Für die Analysen der Genexpression in Gewebeschnitte war eine schnelle und einheitliche Fixierung des Gewebes vonnöten. Um diese zu gewährleisten, wurden die Tiere mit 4 %iger PFA-Lösung perfundiert. Hierfür wurden die Mäuse mit einem Gemisch aus 50 mg/kg Körpergewicht (KG) Ketamin (Albrecht GmbH, Aulenburg) und 10 mg/kg KG Xylazin (*Rompun*; Merck, Darmstadt) in physiologischer Kochsalzlösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in eine letale Narkose versetzt. Die Applikation erfolgte intraperitoneal. Sobald die Tiere keinen Zehenreflex mehr zeigten, wurden sie auf dem Rücken liegend fixiert und der Bauchraum geöffnet. Nach Freilegung des Herzens wurde dieses mit einer Pinzette fixiert und eine Perfusionskanüle (ECOFLO-safety Perfusionsbesteck; DISPOMED Witt oHG, Gelnhausen) in die linke

Herzkammer eingeführt. Der rechte Vorhof wurde sodann punktiert. Anschließend wurden mit leichtem, aber konstantem Druck etwa 25 ml 1x PBS, gefolgt von 25 ml 4 % PFA in das Blutgefäßsystem der Maus appliziert. Die Flüssigkeitsmenge war abhängig von der Größe der Maus. Das Blut konnte auf diese Weise schnell durch 1x PBS ersetzt werden, sodass das Fixativ PFA das Gewebe gut fixieren konnte. Im Anschluss wurden die gewünschten Organe entnommen und für 2 h in PFA bei 4°C nachfixiert. Um überschüssiges PFA zu entfernen, wurden die Gewebe kurz in 1x PBS gespült und über Nacht in 30 % Saccharose in 1x PBS bei 4°C unter leichtem Schwenken inkubiert. Am Folgetag wurden die Gewebe auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C oder -20°C gelagert.

3.5.3.2 Gewinnung von Geweben für RNA-Extraktionen

Für die Analyse der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden C57BL/6-Mäuse sowie heterozygote und homozygote Tiere der generierten Mauslinien herangezogen. Zu diesem Zweck wurden die Tiere mittels einer Überdosis des Inhalationsanästhetikums Isofluran (Baxter, Wien, A) getötet. Anschließend erfolgte umgehend die Blutabnahme mittels Herzpunktion in eine mit 1,6 mg EDTA-K⁺/ml-Blut-beschichtete Monovette (Sarstedt, Nümbrecht) und die Entnahme von Organen bzw. Organabschnitten der Maus. Diese wurden in Reaktionsgefäße überführt, unmittelbar in flüssigen Stickstoff verbracht und bis zur Aufarbeitung (RNA-Extraktion; 3.5.4.1) bei -80°C gelagert.

3.5.3.3 Gewinnung von Zungenepithel

Für die Analyse des fluoreszierenden Zungenepithels der *Tas1r1^{Rho-IRE5-hrGFP}*-Maus wurden diese mittels Überdosis des volatilen Anästhetikums Isofluran (siehe 3.5.3.2) getötet und die Zunge sogleich entnommen und in Normal Tyrodes aufbewahrt. Nach Injektion eines Enzymmixes, bestehend aus 2,7 mg/ml Dispase II, 1 mg /ml Kollagenase A und 1 mg/ml Trypsin-Inhibitor in Normal Tyrodes, unter das Epithel der Zunge, wurde das Gewebe 20 min in Ca²⁺/Mg²⁺-freiem Tyrodes unter Zufuhr von Luft (Linde, München) in Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgte die Isolation des Epithels vom restlichen Zungengewebe durch meine Kollegin Sandra Hübner. Nach Inkubation des Epithels für 10 min in PFA und einem kurzen Waschschrift in Normal Tyrodes wurde das Gewebe möglichst plan auf einen Objektträger aufgezogen. Das Epithel wurde mit *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, Hamburg) eingedeckt. Die Auswertung und Digitalisierung erfolgte mit dem Mirax Scansystem (siehe 3.5.8).

3.5.3.4 Anfertigung von Gefrierschnitten

Für die Analysen von Gewebeschnitten mittels *In-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie mussten die perfundierten Gewebe auf Objektträger verbracht werden. Hierfür wurden die Organe mit *Jung Tissue Freezing Medium* (Leica, Wetzlar) auf einem Objektisch fixiert und am Gefriermikrotom (Kryostat) geschnitten. Die Gewebeschnitte wurden bei -22 ± 4°C angefertigt und auf positiv geladene Objektträger *SuperFrost Plus* (Menzel-Gläser, Braunschweig) überführt. Die Schnittdicke des Gewebes betrug mit Ausnahme von Augengewebe (20 µm) stets

14 µm. Die Gewebeschnitte wurden entsprechend der vorgesehenen Analysen bei -20°C (Immunhistochemie) oder -80°C (*In-situ*-Hybridisierung) bis zur Prozessierung gelagert.

3.5.3.5 Anfertigung von Paraffinschnitten

Für die Analyse der Rho-Expression in *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Mäusen wurden Paraffinschnitte von Zungen- und Augengewebe mit 10 µm Schnittdicke angefertigt. Hierfür wurde das Gewebe dehydriert, in Paraffin eingebettet und bei RT am Mikrotom geschnitten. Die Anfertigung der Paraffinschnitte erfolgte durch Elisabeth Meyer.

3.5.4 Analysen der Genexpression auf mRNA-Ebene

Bei den notwendigen Arbeitsschritten für die Analysen der Genexpression auf mRNA-Ebene wurden stets RNase-arme bzw. -freie Materialien genutzt und die Arbeitsflächen sowie benötigte Apparaturen durch den Einsatz von *RNase-away-Spray* (Invitrogen, Darmstadt) RNase-arm gehalten.

3.5.4.1 RNA-Extraktion

Das bei -80°C gelagerte Gewebe wurde gefroren in ein mit 1 ml Trizol präpariertes 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mittels *Tissue lyser* homogenisiert (je nach Gewebe 5 min bis 10 min). Inhomogene Gewebereste wurden bei 12000 g und 4°C innerhalb von 10 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß verbracht. Es folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion unter Zugabe von 0,2 ml Chloroform. Nach 5 min Inkubation der Proben bei RT und einer halbstündigen Zentrifugation bei 12000 g und 4°C lagen Proteine und Lipide in der unteren Chloroform-Phenol-Phase vor. In der Interphase waren leichtere Proteine und DNA enthalten, während die RNA in der oberen wässrigen Phase lokalisiert war. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt (500 µl bis 650 µl), mit 0,5 ml Isopropanol für 10 min bei 4°C gefällt und durch Zentrifugation (12000 g, 4°C, 30 min) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 10 µl bis 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Qualität der RNA wurde in einem denaturierenden Agarosegel überprüft und die Konzentration photometrisch am Spectrophotometer Nanodrop ND-1000 ermittelt. Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -80°C.

3.5.4.2 cDNA-Synthese

Kontaminationen und genomische Rückstände stellen die Hauptursache für falsch positive RT-PCR-Ergebnisse dar. Um diese Gefahr zu minimieren wurden die extrahierten RNA-Proben einem DNase-Verdau unterzogen. Hierfür wurden 2 µg RNA mit DNase I (2 U), 1x-DNase-Puffer, DTT (1 mM), RNase-Inhibitor (20 U) in einem Volumen von 20 µl für 30 min bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von EDTA (0,25 mM) und einer Hitzebehandlung bei 65°C für 10 min. Im Folgenden schloss sich die reverse Transkription an, bei der durch den Einsatz der reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Diese Umschreibung erfolgte jeweils in

Anwesenheit (+RT) oder Abwesenheit (-RT) reverser Transkriptase. Zu diesem Zweck wurden zweimal 1 µg DNase-behandelte RNA mit 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl *Random Primer* (Invitrogen, Darmstadt) zusammenpipettiert und zur Anlagerung der Oligonukleotide für 5 min auf 65°C erhitzt. Dem ersten Reaktionsansatz wurden in 1x *First Strand Buffer*, 10 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 10 U RNase-Inhibitor und 200 U reverse Transkriptase *Superscript II* hinzugefügt. Dem -RT-Reaktionsansatz wurden die gleichen Komponenten mit Ausnahme der reversen Transkriptase beigemischt. Beide Reaktionsansätze wurden im Thermocycler für 10 min bei 25°C, gefolgt von 3 h Synthesereaktion bei 42°C, inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen der Proben für 15 min auf 70°C abgebrochen und die Proben bei 4°C gelagert. Die cDNA diente im Anschluss als Matrize für die Amplifikation spezifischer Sequenzen in PCRs.

3.5.4.3 *In-situ*-Hybridisierung

Der Einsatz der *In-situ*-Hybridisierung bietet die Möglichkeit die Expression eines Genes *in situ*, das heißt am Ort, an dem sie natürlicherweise vorkommt, nachzuweisen. Hierfür wurden Gewebeschnitte von perfundierten Tieren in zwei – in ihrer Sensitivität – Protokollen mit nichtradioaktiven Digoxigenin-(DIG)-markierten RNA-Sonden behandelt.

3.5.4.3.1 *In-vitro*-Transkription von cRNA-Sonden

Zur Generierung von RNA-Hybridisierungssonden wurden genspezifische PCR-Produkte von etwa 210 bp bis 890 bp Länge in TOPO-TA- oder pBluescript-Vektoren kloniert. Diese wurden durch geeignete Restriktionsenzyme linearisiert und unter Verwendung DNA-abhängiger RNA-Polymerasen von *E.coli in vitro* transkribiert. Hierfür wurde 1 µg linearisiertes Vektorkonstrukt mit 60 U RNA-Polymerase, 1x-RNA-Polymerase-Puffer, 48 U RNase-Inhibitor und 1x *DIG RNA Labeling Mix* (Roche Diagnostics, Mannheim) in einem finalen Volumen von 50 µl für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von RNase-freier DNase I (4 U, Invitrogen oder 8 U Turbo DNase, Ambion) verdaut. Um einen vollständigen Abbau des Vektorkonstruktes zu gewährleisten, wurde nach 30 min erneut 2 U RNase-freie DNase I hinzugefügt. Mittels Ethanolpräzipitation erfolgte die Aufreinigung der RNA-Sonden zur Entfernung von Proteinen, Salzen und Oligonukleotide der DNA-Matrize sowie nicht eingebauter Nukleotide. Hierfür wurde den Proben 15 µl 10 M Ammoniumacetat und 150 µl 100 % Ethanol zugesetzt (siehe 3.1.12). Das nach Zentrifugation gewonnene RNA-Pellet wurde in 75 % Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Vermessung der Konzentration der DIG-markierten Sonden erfolgte am Spectrophotometer Nanodrop ND-1000. Zur Überprüfung der Qualität der *In-vitro*-Transkription wurden 2 µl jedes Reaktionsansatzes vor und nach dem DNase I-Verdau entnommen und zusammen mit 1 µl des finalen Produktes auf ein 1,5 % denaturierendes Agarosegel (siehe 3.1.2.2) aufgetragen. Die RNA-Proben wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.5.4.3.2 Vorbehandlungen und Hybridisierung von Gefrierschnitten

Um die Zugänglichkeit des Gewebes für die Sonden zu erhöhen und den Hintergrund so gering wie möglich zu halten, wurden die Schnitte nach der Fixierung einigen Vorbehandlungen unterzogen. Hierzu zählen die Inkubation der Schnitte mit Proteinase K zur Verbesserung der Zugänglichkeit des Gewebes und die Acetylierung von Aminogruppen zur Verminderung der Hintergrundsignale (Hayashi *et al.*, 1978).

Die Gewebeschnitte wurden zunächst für 5 min in PFA fixiert. Es folgte ein Waschschrift von 1 min in PBS und eine Inkubation in 0,2 M HCl für 10 min, gefolgt von 2 min in einer 1 % Triton-X-100-Lösung in 1x PBS. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min mit 0,15 U (20 µg/ml) Proteinase K recombinant in 1x PBS-Lösung inkubiert. Diese Reaktion wurde durch die anknüpfende Inkubation in 0,2 % Glycin in 1x PBS abgestoppt. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1x PBS für je 5 min, eine erneute Fixierung mit PFA und abermals Waschen mit 1x PBS. Im Folgenden wurden die Schnitte in Wasser mit 0,1 M Triethanolamin getaucht und mit 0,25 % Essigsäureanhydrid für 10 min acetyliert. Nachfolgend wurde erneut mit 1x PBS gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte bei 50°C in einer mit 50 % Formamid befeuchteten Kammer für 4 h bis 6 h. Hierfür wurden die Schnitte mit 500 µl Prähybridisierungslösung je Objektträger bedeckt. Im Anschluss wurde Prähybridisierungspuffer entfernt, die Schnitte mit 100 µl Hybridisierungspuffer bedeckt und mit Deckgläschen abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht mit 600 ng/ml bis 800 ng/ml RNA-Sonde in einer mit 50 % Formamid befeuchteten Kammer bei 50°C (vgl. Tab. 8.3). Sowohl der Prähybridisierungs- als auch der Hybridisierungspuffer wurden vor ihrer Verwendung zur Denaturierung der enthaltenen Nukleinsäuren 10 min bei 85°C erhitzt.

3.5.4.3.3 Nachweis der DIG-Markierung in Gefrierschnitten

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen entfernt und die Objektträger dreimal für jeweils 5 min in 2x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min bei 37°C in RNase-Puffer mit 1 µg/ml oder 2 µg/ml RNase A inkubiert (vgl. Tab. 8.3). Hieran anknüpfend erfolgte ein Waschschrift mit 0,4x oder 1x SSC bei RT für 15 min, gefolgt von zwei weiteren Waschschriffen (jeweils 30 min) im selben Puffer bei 50°C (vgl. Tab. 8.3). Danach wurden die Gewebeschnitte 5 min in Puffer 1 äquilibriert und 1 h mit 500 µl Puffer 2 je Objektträger in einer 5x-SSC-befeuchteten Kammer blockiert. Der Nachweis der RNA-Sonde erfolgte über einen in Puffer 2 verdünnten Anti-DIG-Antikörper, der für 1 h auf die Schnitte gegeben wurde. Dieser Antikörper war an eine Alkalische Phosphatase gekoppelt, welche nach zwei Waschschriffen mit Puffer 1 (jeweils 30 min bei RT) und 5 min Äquilibrierung in Puffer 3 für die Umsetzung der Farbsubstrate Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT; Roche Diagnostics, Mannheim) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP; Roth, Karlsruhe) in ein unlösliches, rotbraunes bis violette Präzipitat verantwortlich war. Die Farbsubstrate NBT und BCIP wurden gemeinsam in Puffer 3 auf die Schnitte (in einer 5x-SSC-befeuchteten Kammer) appliziert und in Dunkelheit über Nacht inkubiert. Die Präzipitate zeigten den Bindungsort des Antikörpers an das DIG an und visualisierten auf diese Weise die Bindung der cRNA-Sonden an komplementäre mRNA-Sequenzen im Gewebe. Die Reaktion wurde durch Abgießen des Farbsubstrats und Eintauchen

des Gewebes in TE-Puffer abgestoppt. Abschließend wurden die Schnitte mit *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, Hamburg) eingedeckt. Die Auswertung und Digitalisierung erfolgte mit der Hellfeldfunktion des Fluoreszenzmikroskopes (siehe 3.5.5). Die bei den jeweiligen Sonden angewandten Konditionen sind der Tab. 8.3 im Anhang zu entnehmen.

3.5.4.3.4 Vorbehandlung und Nachweis der DIG-Markierung in Gefrierschnitten mit Amplifikationsschritt

Für den Nachweis der nur sehr schwach exprimierten mRNA der Bitterrezeptors Tas2r114 wurde eine *In-situ*-Hybridisierung mit einem Amplifikationsschritt etabliert. Die Amplifikation beruht auf der katalytischen Aktivität der Meerrettich-Peroxidase, die das *Tyramid signal amplification* (TSA)-Substrat zu freien Radikalen umsetzt, die an aromatische Aminosäuren wie Tyrosin oder Tryptophan in unmittelbarer Umgebung kovalent binden. Nach Ablage der biotin-gekoppelten Tyramide auf dem Gewebe können diese durch Streptavidin-Biotin-Interaktionen detektiert werden. Dies resultiert in einer 100-fachen Steigerung der Sensitivität. Die Vorbehandlung der Schnitte glich der in Abschnitt 3.5.4.3.2 beschriebenen Vorgehensweise, mit der Ausnahme, dass der Inkubation mit HCl eine zehnmütige Behandlung mit 3 % Wasserstoffperoxid in 1x PBS, gefolgt von zwei Waschschritten (jeweils 5 min) mit 1x PBS voraus ging. Die Wasserstoffperoxidbehandlung war nötig, um die Aktivität endogener Peroxidasen des Gewebes zu unterdrücken. Die Hybridisierung der Sonden erfolgte ebenfalls über Nacht in einer mit 50 % Formamid befeuchteten Kammer bei 50°C, jedoch nur mit einer Sondenkonzentration von 200 ng/ml. Anschließend erfolgte, wie in Abschnitt 3.5.4.3.3 ausgeführt, ein RNase-Verdau (1 µg/ml) und das Waschen der Gewebeschnitte mit 0,4x SSC bei 60°C. Der Äquilibrierung der Schnitte mit Puffer 1 und der Blockierung mit Puffer 2 schloss sich hier allerdings eine zweistündige Inkubation mit einem Anti-DIG-POD-Antikörper bei 37°C an. Es folgten drei Waschschriffe von je 5 min mit TBS, an die sich die Signalverstärkung mittels *Tyramide Signal Amplification* (TSA, TSA™ Biotin Indirect System) anschloss. Hierzu wurden die Schnitte für 10 min mit Biotin-Tyramid (1:75 verdünnt in *Amplification Diluent*) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen mit 1x TBS, wurden die Schnitte in einer mit 5x-SSC-befeuchteten Kammer für 1 h mit der Streptavidin-gekoppelten Alkalischen Phosphatase inkubiert. Es schlossen sich zwei Waschschriffe mit Puffer 1 (jeweils 30 min bei RT) und die Äquilibrierung in Puffer 3 an. Die Inkubation mit dem Farbsubstrat (siehe 3.5.4.3.3) erfolgt nur für 8 min, bevor die Reaktion mit TE-Puffer abgestoppt und die Schnitte mit *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, Hamburg) eingedeckt wurden.

3.5.5 Hellfeld-Mikroskopie

Die Begutachtung der mRNA-Expression sowie die Digitalisierung dieser wurden am Axioplan-Mikroskop mit Hilfe der *Meta Morph*-Software vorgenommen. Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung eines Objektivs mit 40-facher Vergrößerung.

3.5.6 Analysen der Genexpression auf Protein-Ebene

Der Nachweis von Proteinen – in diesem Fall von Opsinen und verschiedenen Zelltypmarkern der Geschmacksknospenzellen im Gewebe – erfolgte mit Hilfe der Immunhistochemie. Die Grundlage dieses Verfahrens beruht auf der Erkennung von Proteinstrukturen durch das Epitop eines Erstantikörpers, der mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers visualisiert wird. Hierfür wurden Kryoschnitte von perfundierten Tieren in zwei, in ihrer Sensitivität variierenden Protokollen prozessiert.

3.5.6.1 Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte wurden zu Beginn für 5 min in PFA fixiert und anschließend zweimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Zur Steigerung der Zugänglichkeit der Antikörper wurden die Gewebe anschließend für 10 min mit 0,5 % Triton-X 100 in 1x PBS permeabilisiert und zweimal mit TNT für 5 min gewaschen. Hieran anknüpfend erfolgte die Blockierung des Gewebes mit TNB für 30 min bis 60 min, der sich die Inkubation des ersten Antikörpers über Nacht bei 4°C in einer Feuchtekammer anschloss. Nach dreimaligem Waschen mit TNT (jeweils 10 min) fand die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in TNB für 1 h bei RT statt, an die sich erneut drei Waschschrte anschlossen.

Bei der Durchführung von Kofärbungen erfolgte die Inkubation der Primärantikörper parallel zueinander. Die Inkubation der Sekundärantikörper wurde hingegen aufeinanderfolgend ausgeführt und durch drei TNT-Waschschrte von 10 min getrennt. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit einem Fluoreszenz-stabilisierenden Einbettmedium (*Fluorescent Mounting Medium*; Dako, Hamburg) eingedeckt.

Für die Anwendung des AADC-Antikörpers war darüber hinaus eine Demaskierung zur Verbesserung der Zugänglichkeit der Antikörperbindungsstellen nötig. Hierfür wurden die Gewebeschnitte nach der Fixierung für 10 min im Wasserbad bei 80°C in Citratpuffer (*Target Retrieval Solution*; Dako, Hamburg) erhitzt.

Für die Detektion von Rho fand das *VECTOR M.O.M. Immundetection Kit* Anwendung. Hierfür wurden Paraffin-Gewebeschnitte vor der Inkubation mit PFA den folgenden Behandlungsschritten zur Deparaffinierung unterzogen: 3 min und 5 min Toluol, 2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 90 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol, 5 min 40 % Ethanol und 5 min Wasser. An die Fixierung schloss sich die Erhitzung der Gewebeschnitte bei 80°C in Citratpuffer und eine kurze Inkubation in 1x PBS an. Anschließend wurden die Gewebeschnitte nach einer Triton-Inkubation zweimal für 5 min mit 1x PBS gewaschen und 1 h mit dem *M.O.M. mouse Ig blocking reagent* blockiert. Dem folgten zwei kurze Waschschrte in PBS, 5 min in *M.O.M. diluent* und die Inkubation des Rho-Antikörpers in *M.O.M. diluent* über Nacht bei 4°C. Die Detektion fand über einen biotinylierten Anti-Maus- und Streptavidin-Alexa-Fluor-633-Antikörper (jeweils für 1 h bei RT in *M.O.M. diluent* inkubiert) statt. Vor der Inkubation der Paraffinschnitte in PFA wurden folgende Inkubationsschrte zur Deparaffinierung durchgeführt: 3 min und 5 min Toluol, 2x 5 min 100 % Ethanol, 5 min 90 % Ethanol, 5 min 70 % Ethanol, 5 min 40 % Ethanol und 5 min Wasser.

3.5.6.2 Immunhistochemie mit Amplifikationsschritt

Unter Einbeziehung des TSA-Amplifikationsschrittes (siehe 3.5.4.3.4) konnte auch auf Proteinebene die Sensitivitätsgrenze gesteigert werden. Im Zuge der immunhistochemischen Analysen war dies für den Nachweis des Opsin sws notwendig. An die Fixierung mit PFA und den zwei Waschschrritten mit PBS schloss sich hier eine Wasserstoffperoxidbehandlung zur Unterdrückung endogener Peroxidasen an. Hierfür wurden die Gewebeschnitte für 30 min mit 0,6 % Wasserstoffperoxid in kaltem Methanol inkubiert. Es folgten zwei Waschschrritte mit PBS und eine Inkubation mit 0,5 % Triton-X 100 in PBS für 10 min, an die sich, wie in 3.5.6.1 geschildert, Waschungen mit TNT, die Blockierung mit TNB und die Inkubation mit dem primären Antikörper in TNB anschloss. Darauf folgten drei Waschschrritte mit TNT und 1 h Inkubation mit einem Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper, der die Spezies des Primärantikörpers erkannte. Anschließend wurde erneut dreimal (jeweils 10 min) mit TNT gewaschen und die Gewebeschnitte mit Streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*; 1:100 in TNB, Perkin Elmer, Rodgau) für 1 h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Nach drei kurzen Waschschrritten mit TNT (jeweils 5 min) erfolgte die Inkubation mit Biotin-Tyramid Plus des TSA™ Plus Biotin Kits, welches 1:75 verdünnt in *Amplification Diluent* für 7 min eingesetzt wurde. Es folgten drei Waschschrritte mit TNT von je 10 min und die Inkubation mit einem Streptavidin-Alexa-Fluor-488-Antikörper in der Feuchtekammer für 1 h. Anschließend wurde erneut dreimal mit TNT gewaschen und die Objektträger schließlich mit *Fluorescent Mounting Medium* (Dako, Hamburg) eingedeckt.

3.5.7 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Die Auswertung und Digitalisierung der fluoreszenzmarkierten Gewebeschnitte wurde am inversen konfokalen Mikroskop mit Laserlichtquelle und der LCS-Software umgesetzt. Die Anregung erfolgte für Alexa Fluor 488 mit einem Argon-Laser, für Alexa Fluor 546 mit einem Neon-Laser und für Alexa Fluor 633 mit einem Helium-Neon-Laser. Die Aufnahmen erfolgten unter Verwendung eines 40-fachen Objektivs. Die verwendeten Konditionen sind in Tab. 3.2 aufgeführt.

Tab. 3.2. Konditionen der Laserlichtquellen bei Fluoreszenzaufnahmen am konfokalen Mikroskop.

	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 488 (ICC)	Alexa Fluor 546	Alexa Fluor 633	Alexa Fluor 633 (ICC)	Alexa Fluor 647	hrGFP (Eigenfluoreszenz)
Anregungsbereich	488 nm	488 nm	561 nm	633 nm	633 nm	647 nm	488 nm
Detektionsbereich	515 - 525 nm	500 - 570 nm	580 - 640 nm	650 - 740 nm	640 - 710 nm	645 - 690 nm	500 - 520 nm
Laserleistung	40 %	70 %	45 %	50 %	90 %	20 %	80 %

3.5.8 Mirax Scansystem

Für die Analyse des fluoreszierenden Zungenepithels von Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Tieren wurde das Mirax Scansystem und die Mirax Viewer-Software herangezogen. Die eingesetzten Filtersätze von Carl Zeiss Mikroskopie (Göttingen) und AHF Analysetechnik AG (Tübingen; hrGFP-Filter-satz) und verwendeten Belichtungszeiten sind in Tab. 3.3 aufgeführt.

Tab. 3.3. Konditionen für Fluoreszenzaufnahmen des hrGFPs am Mirax Scansystem.

	hrGFP Eigenfluoreszenz
Filterset	hrGFP
Anregungsbereich	500 - 505 nm
Emissionsbereich	-
Belichtungszeit	80 - 150 ms
elektrische Verstärkung	2

3.6 Arbeiten mit Oozyten des *Xenopus laevis*

3.6.1 Oozyten des *Xenopus laevis*

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* sind aus der meiotischen Teilung entstandene Keimzellen, die in der Prophase arretiert sind. Innerhalb dieser Phase unterscheidet man nach Dumont sechs Stadien, die sich im Wesentlichen durch variierende Größen und Pigmentierungen voneinander abgrenzen (Bossi *et al.*, 2007). Die weitgehend undifferenzierten Oozyten zeigen auf Grund der großen Anzahl an Ribosomen hohe Translationsraten, die eine schnelle Proteinbiosynthese ermöglichen. Daher werden die Oozyten, die sich auf Grund ihrer Größe relativ leicht mit Elektroden anstechen lassen, als zelluläres Expressions- und Translationssystem injizierter, *in vitro* transkribierter RNA (cRNA) und Poly(A)-RNA genutzt.

Die Oozyten enthalten einen G-Protein-abhängigen Signalweg, der Chloridkanäle in der Plasmamembran via intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen reguliert (Parker & Miledi, 1986; Berridge, 1989; Sigel & Minier, 2005). Die Aktivierung dieses Signalweges bedingt den Einstrom von Cl⁻-Ionen, was zu Veränderungen des Stromflusses führt, der mittels der unten beschriebenen Zwei-Elektroden-Spannungsklemme detektiert und aufgezeichnet werden kann.

3.6.2 Oozytenpräparation

Die Oozyten von *Xenopus laevis* befinden sich in sackartigen Gebilden, den so genannten Mesovarien im Bauchraum des Frosches. Die Oozyten der verschiedenen Stadien liegen hier in Gewebe aus Follikelepithel und Ovarepithel vor. Um Teile des Ovars zu entnehmen, wurde der Frosch in einem Bad mit Narkoselösung (0,1-0,15 % Ethyl-m-Aminobenzoensäure-Lösung mit 25 mM Natriumhydrogencarbonat; jeweils Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gelegt, dessen Wirkstoff der Frosch über die Haut absorbierte. Die Narkotisierung erfolgte über einen Zeitraum von etwa 15 min. Deren Wirkung wurde mittels Zwischenzehreflex getestet, welcher durch die Narkose

vollständig unterdrückt sein sollte. Die Entnahme der Oozyten erfolgte durch Ines Grüner oder Dr. Frauke Stähler. Mit Hilfe eines Skalpells wurde oberhalb der Leistengegend ein etwa ein Zentimeter großer Schnitt in die Bauchdecke und die darunterliegende Muskelschicht vorgenommen. Durch die so entstandene Öffnung wurden vorsichtig mit Hilfe einer Pinzette die Ovarialsäckchen gegriffen und isolierte Anteile des Ovars anschließend unter dem Binokular qualitativ beurteilt. Genügten die Oozyten den Qualitätsansprüchen, wurde die benötigte Menge an Oozyten entnommen und die Öffnung geschlossen. Dazu wurde zunächst die Muskelschicht, danach die Lederhaut mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl* rapid 4-0 bis 6-0, Ethicon by Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt) verschlossen. Nach Beendigung der Operation wurde der Krallenfrosch separat in eine abgedunkelte Wanne mit Leitungswasser gesetzt. Erst als das Narkotikum seine Wirkung vollkommen verloren und der Frosch sich nach einigen Stunden komplett erholt hatte, wurde er wieder in ein Haltebecken gesetzt.

3.6.3 Enzymatische Defollikulierung von Oozyten

Die Oozyten des Krallenfrosches sind von vier zellulären und azellulären Hüllschichten umgeben (Dumont & Brummett, 1978). Um die Oozyten aus dem ovarialen Gewebe zu vereinzeln, wurden die entnommenen Ovarialsäckchen in kleinere Einheiten, bestehend aus 30 bis 40 Oozyten, zerteilt. Diese mechanische Separation erleichterte die nachfolgende enzymatische Defollikulierung mit Kollagenase.

Hierfür wurden die Oozyten in Ca^{2+} -freien Puffer (Ca^{2+} -freier KulORi) überführt, in dem sie zunächst über einen Zeitraum von 15 min wiederholt Waschschritten unterzogen wurden. Die Kollagenase wurde mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml im selben Ca^{2+} -freien Puffer gelöst. Die Oozyten inkubierten in dieser kollagenasehaltigen Lösung für etwa 15 min bis 20 min (Sigma) oder 40 min bis 45 min (Serva, Variationen der Inkubationsdauer je nach Aktivität des Enzyms) unter ständiger Bewegung (Schüttler). Lag der Großteil der Oozyten vereinzelt und defollikuliert vor, wurde die enzymatische Reaktion durch wiederholtes Spülen mit Ca^{2+} -freiem KulORi abgestoppt und die restliche Kollagenase entfernt. Im Anschluss wurden die Oozyten in den Kultivierungspuffer (modifizierte Barth-Lösung mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin/Streptomycin, 2,5 mM Natriumpyruvat und 2,5 mM Glucose) überführt, in dem sie zur Regeneration mindestens 2 h bei 16°C verblieben, ehe sie zur cRNA-Injektion eingesetzt wurden. Hierfür wurden Oozyten des Stadiums V und VI mit homogener Pigmentierung und gleichmäßig runder Form unter dem Binokular aussortiert.

3.6.4 Generierung von cRNA zur Oozyteninjektion

Um oozytenfremde Proteine durch Proteinbiosynthese in der Oozyte zu erzeugen, wurde in diese spezifische cRNA injiziert. Zur Generierung der cRNA von humanem Rho (*Accession number*: NM_000539.3) murinem Opsin sws (*Accession number*: NM_007538), murinem Opsin mws (*Accession number*: NM_008106), humanem α -Gustducin (*Accession number*: NM_001102386) und humaner PLC (*Accession number*: NM_004573) wurden die kodierenden Sequenzen in den Oozytenexpressionsvektor (pGEMHE5-Vektor) kloniert (siehe 3.1.7 und 3.1.10.1). Die Klonierung erfolgte über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xba*I (Rho,

Opsin mws), *EcoRI* und *HindIII* (Opsin sws), *PmeI* und *SmaI* (Gustducin) beziehungsweise *XbaI* und *SpeI* (PLC), die in der MCS (*multiple cloning site*) des pGEMHE5-Vektors lokalisiert sind.

Die Ligation erfolgte mittels *rAPid DNA Dephos and Ligation Kit*. Nach Überprüfung der Sequenz wurden in Vorbereitung der *In-vitro*-Transkription 10 µg der Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease *NotI* (Opsine) bzw. *NheI* (Gustducin und PLC) linearisiert und via Gelextraktion aufgereinigt. 1 µg des Eluats wurde anschließend für die *In-vitro*-Transkription mittels *mMESSAGE mMACHINE® T7 Ultra Kit*, welches nach Angaben des Herstellers angewandt wurde, eingesetzt. Für die Umschreibung wurde die Promotorregion der T7-RNA-Polymerase genutzt. Die *mMESSAGE mMACHINE*-Reaktion umfasste neben der eigentlichen *In-vitro*-Transkription auch ein *RNA-Capping* am 5'-Ende mittels des *Cap-Analogs* m7-G(5')ppp(5')G. An die cRNA-Synthese schloss sich die Hydrolyse der cDNA durch Zugabe des Enzyms DNase I an. Abschließend wurde die cRNA zur weiteren Stabilisierung einem *Poly(A)-Tailing* am 3'OH-Ende unter Zuhilfenahme der *E.coli*-Poly(A)-Polymerase (*E-PAP*) des *Poly(A) Tailing Kits* unterzogen. Die gewonnene cRNA wurde mittels des *MEGAclear™*-Kit aufgereinigt und via Präzipitation mit 5 M Ammoniumacetat aufkonzentriert.

3.6.5 Generierung von Poly(A)-RNA

Für die Präparation der Poly(A)-RNA wurden 40 Augen von C57BL/6-Mäusen nach Entfernung des umliegenden Gewebes und der Linse zusammengetragen und zur RNA-Extraktion via Phenol-Chloroform-Extraktion eingesetzt (siehe 3.5.4.1). Die gewonnene Gesamt-RNA wurde anschließend zur Anreicherung der Poly(A)-RNA und Entfernung von ribosomaler RNA via Oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie mittels *MicroPoly(A)Purist™-Kit* eingesetzt (Romero *et al.*, 1998; Knox *et al.*, 2000). Die so generierte Poly(A)-RNA wurde nach Präzipitation mit Ammoniumacetat, Glycogen und Ethanol direkt zur Injektion eingesetzt.

3.6.7 cRNA- und Poly(A)-RNA-Injektion

Für die Injektion der cRNA in *Xenopus*-Oozyten wurden Glaskapillaren (*World precision instruments, Inc.*; Typ GB 100T-8P) in einen Mikroinjektor eingespannt und eine Injektion von 64 nl RNA pro Oozyte in die vegetative (weiß-gelbe) Hemisphäre vorgenommen. Die Injektionen wurden von Stefanie Demgensky oder Katja Riedel ausgeführt. Das injizierte Volumen enthielt 10 ng Opsin-cRNA beziehungsweise 10 ng Opsin-cRNA, 5 ng Gustducin-cRNA und 5 ng PLC-cRNA. Die Poly(A)-RNA wurde in einer Konzentration von 3 ng pro Oozyte allein oder nebst der oben angeführten Rho-cRNA injiziert. Den Kontrolloozyten wurde statt cRNA DEPC-Wasser injiziert, um mögliche injektionsbedingte Beeinflussungen ausschließen zu können. Nach der Injektion wurden die Oozyten wie in Knox *et al.* (1993) und Mole *et al.* (1996) beschrieben drei bis vier Tage bei 16°C in modifizierter Barth-Lösung kultiviert (Abb. 3.4).

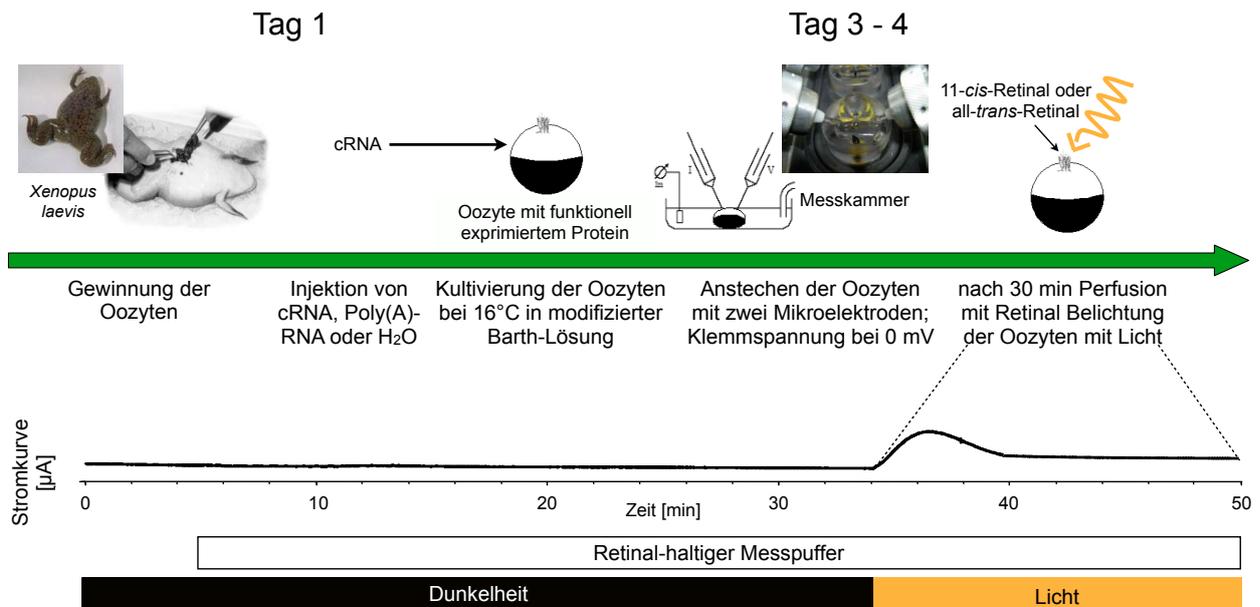


Abb. 3.4. Schematischer Ablauf der Oozytenexperimente. Nach Gewinnung der Oozyten und enzymatischer Defollikulierung wurden diese zur Injektion von cRNA (humanes Rhodopsin, murines Opsin, α -Gustducin und Phospholipase C β 2) bzw. Poly(A)-RNA und cRNA oder Wasser eingesetzt. Nach der Injektion wurden die Oozyten drei bis vier Tage bei 16°C in modifizierter Barth-Lösung kultiviert. Während dieser Zeit exprimierten die Oozyten die Opsine, α -Gustducin und Phospholipase C β 2 als funktionelle Proteine. Zur Analyse der Oozyten wurden diese mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in Messkammern des OpusXpress 6000 A gemessen. Dazu wurden die Oozyten mit zwei Glasmikroelektroden angestochen und das Membranpotential auf 0 mV gehalten. Die Oozyten wurden unter Abwesenheit von Licht für 30 min mit 11-cis- oder all-trans-Retinal-haltigem Puffer (Retinal-Konzentration: 20 μ M) umspült. Die Retinal-Inkubation wurde nachfolgend für weitere 15 min bis 30 min fortgesetzt. Währenddessen wurden die Oozyten mit Licht diverser Lichtquellen exponiert.

Der Kultivierungspuffer in den Petrischalen wurde täglich gewechselt, um eine möglichst keimfreie Umgebung zu gewährleisten. Abgestorbene oder überreife Oozyten, die zur Anregung der Reifung anderer Oozyten beigetragen hätten, wurden entfernt.

3.6.8 Durchführung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Experimente

Die Oozytenexperimente wurden an der Arbeitsstation OpusXpress, die eine zeitgleiche Messung von acht Oozyten erlaubte, durchgeführt. Für die Messung wurden Glaskapillaren (World precision instruments, Inc.; Typ TW 150F-6) luftblasenfrei mit 3 M KCl-Lösung befüllt und die Elektroden aus chloridiertem Silberdraht in die mit Elektrolytlösung gefüllten Glaskapillaren eingeführt. Für die Experimente wurden Mikroelektroden eingesetzt, die einen Gesamtwiderstand zwischen 0,5 M Ω und 2,5 M Ω aufwiesen.

Alle Experimente wurden bei RT durchgeführt. Als Laufpuffer diente ein Ca²⁺-Messpuffer, dessen erhöhte Ca²⁺-Konzentration die durch den Stimulus induzierten Ionenströme verstärken sollte (Miledi, 1982, Shapira *et al.*, 1990; Lupu-Meiri *et al.*, 1990). Nach Klemmen des Membranpotentials der Oozyten auf 0 mV wurden diese in Abwesenheit von Licht für 5 min mit der 28 mM Ca²⁺-haltigen modifizierten Barth-Lösung mit einer Flussrate von 2,5 ml/min umspült. Während dieser Zeit, wurde derselbe Puffer in Dunkelheit mit 11-cis-Retinal (aus

10 mM Ethanollösung; zur Verfügung gestellt von Professor Hofmann und PD Dr. Bartl; Institut für medizinische Physik und Biophysik, Universitätsklinikum Charité; Humboldt Universität Berlin) oder all-*trans*-Retinal (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt, so dass die Kofaktoren der Opsine in einer Endkonzentration von 20 μM die Oozyten anschließend für 45 min mit der Flussrate von 0,5 ml/min umgaben (siehe Messprotokoll). 30 min nach Start der Inkubation der Oozyten mit Retinal wurden diese je nach Experiment mit UV-, Weiß- oder Rotlicht einmalig angeregt.

Messprotokoll:

5 min	Ca ²⁺ -haltige modifizierte Barth-Lösung	Dunkelheit
30 min	Ca ²⁺ -haltige modifizierte Barth-Lösung mit 20 μM Retinal	Dunkelheit
15 min	Ca ²⁺ -haltige modifizierte Barth-Lösung mit 20 μM Retinal	Licht

In einer zweiten Versuchsreihe wurden Oozyten, die mit einem Opsin-, Gustducin- und PLC- α RNA injiziert wurden mit drei bis fünf Lichtquellen verschiedener Wellenlänge stimuliert. Hierfür wurden die Oozyten nach 30 min Inkubation in 11-*cis*-Retinal-haltigem Puffer jeweils 1 min mit UV-Licht (365 nm; 312 nm oder 254 nm), Weißlicht (400 nm bis 750 nm) oder Rotlicht (625 nm bis 750 nm; 700 nm bis 1000 nm oder 880 nm) exponiert. Die Stimuli wurden durch fünfminütige Phasen der Dunkelheit, in denen die Oozyten weiterhin zur Regeneration des Opsins mit 11-*cis*-Retinal umspült wurden, getrennt. Zu diesem Zweck wurde der zweite Schritt des oben angeführten Messprotokolls auf 45 min ausgedehnt.

Die Experimente wurden mit mindestens zwei Oozytenpräparationen und an unterschiedlichen Tagen wiederholt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programmes Clampfit. Die Boxplots wurden mit Graph Pad Prism 4 erstellt. Für die statische Auswertung wurde bei einmaliger Stimulation ein nicht parametischer Test – Kruskal-Wallis-Test – und eine *Post-Hoc*-Analyse mit dem Dunnett-T3-Test angewandt. Die statistische Prüfung der mehrfach, mit verschiedenen Lichtquellen stimulierten Oozyten erfolgte über den Kruskal-Wallis-Test- und den Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur (SPSS 16.0).

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmung des Ligandenspektrums muriner Bitterrezeptoren

Zur Überprüfung der Annahme, dass das Ligandenspektrum der Bitterrezeptoren der Maus dem der orthologen humanen Bitterrezeptoren gleicht (Chandrashekar *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2005; Rozengurt, 2006) und um eine bessere Grundlage für spätere Verhaltensexperimente mit dem Organismus *Mus musculus* und Bitterstoffen zu erzielen, wurde das Agonistenspektrum von 16 Bitterrezeptoren der Maus untersucht. Hierfür wurden HEK293T-G α 16gust44-Zellen mit Rezeptorplasmiden transient transfiziert und in *Calcium-Imaging*-Experimenten auf ihre Aktivierbarkeit durch 114 chemisch divergente Bittersubstanzen analysiert (vgl. Tab. 4.1). Die Bitterrezeptoren waren hierbei so gewählt, dass sowohl sehr ähnliche als auch Rezeptoren mit geringem Verwandtschaftsgrad betrachtet wurden.

4.1.1 Nachweis der Expression transient transfizierter Bitterrezeptoren

Um sicherzustellen, dass eine Aktivierung der Bitterrezeptoren im zellbasierten Assay möglich war, wurde deren Expression und Membranständigkeit immunocytochemisch untersucht. Weiterhin sollte auf diesem Wege sichergestellt werden, dass beobachtete funktionelle Unterschiede zwischen den einzelnen Rezeptoren nicht auf Variationen ihrer Expressionsspiegel zurückzuführen sind. Hierfür wurde der sich in den Plasmiden direkt an die kodierende Sequenz des Bitterrezeptors anschließende *HSV-Tag* mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. Die Expressionsstärke der Fusionsproteine konnte anschließend anhand der bei 488 nm anregbaren Fluoreszenz erfasst werden. Die HEK293T-Zellen selbst wurden mittels Membranfärbung über Concanavalin A (633 nm) detektiert. Die Analyse ergab, dass alle untersuchten Rezeptoren nach transienter Transfektion in HEK293T-Zellen membranständig exprimiert waren, jedoch unterschiedlich stark und häufig. Besonders schwach war die Expression der pEAK10-Konstrukte Tas2r131 und Tas2r136 sowie bei Tas2r103. Die Rezeptoren Tas2r102, Tas2r105, Tas2r109 und Tas2r114 wiesen eine mäßige Expression auf, während die verbliebenen Bitterrezeptoren eine starke Expression zeigten (vgl. Abb. 4.1). Bei Transfektion der Leervektoren von pcDNA5/FRT und pEAK10 wurde demgegenüber keine Fluoreszenz detektiert. Repräsentative Expressionsmuster der Plasmidvektoren in HEK293T-Zellen sind in Abb. 4.1 dargestellt.

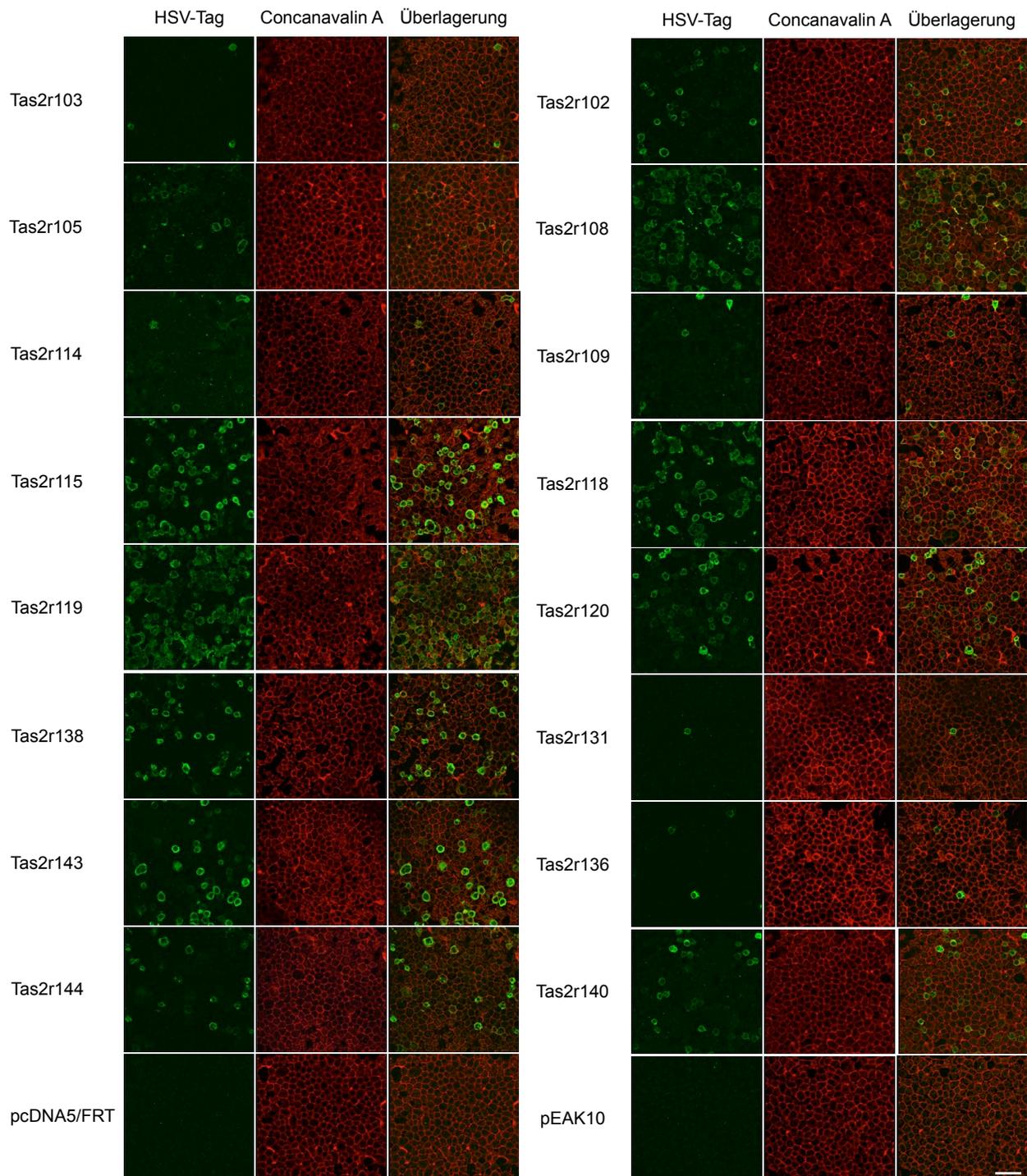


Abb. 4.1. Expression HSV-markierter muriner Bitterrezeptoren nach transientser Transfektion in HEK293T-G α 16gust44-Zellen. Die mit einem HSV-Tag versehenen Plasmide, die für die verschiedenen Bitterrezeptoren der Maus kodierten, wurden transient in HEK293T-G α 16gust44-Zellen eingebracht und mittels einer HSV-Antikörperfärbung nachgewiesen (grün). Die Hälfte der Rezeptorsequenzen war in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT (rechts) und die andere Hälfte in pEAK10 (links) eingebracht. Neben den kodierenden Plasmiden wurden auch die Leervektoren (unten) transfiziert. Die Visualisierung der Zellmembranen aller Zellen erfolgte mit Concanavalin A (rot). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden am konfokalen Laserscan-Mikroskop realisiert. Maßstab: 50 μ m.

4.1.2 Funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren der Maus

In der vorliegenden Arbeit wurden 16 Bitterrezeptoren der Maus im *In-vitro-Assay* auf ihre Aktivierbarkeit durch 99 natürliche und 15 synthetische Verbindungen, die in der Literatur für den Menschen und für einige Mausstämme als bitter beschrieben sind, untersucht (Belitz & Wieser, 1985; Barratt-Fornell *et al.*, 2002; Rouseff, 1990; Maga, 1990; Drewnowski & Gomez-Carneros, 2000). Im Zuge dieser Experimente konnten Agonisten für fünf Bitterrezeptoren identifiziert werden, die bislang als *orphan* galten (Tab. 4.1).

Tab. 4.1. Aktivierbarkeit von 16 Tas2-Rezeptoren der Maus durch natürliche und synthetische Bitterstoffe. Aktivierbarkeit von transient transfizierten HEK293T-Gα.16gust44-Zellen mit Tas2-Rezeptoren der Maus im Calcium-Imaging-System nach Stimulation mit 99 natürlichen und 15 synthetischen Bitterstoffen in ihrer maximal applizierbaren Konzentration. Σ, Summe, der durch einen Bitterstoff aktivierten Rezeptoren; +, Aktivierung; -, keine Aktivierung; *, Aktivierung nur bei 3 mM; **, Aktivierung nur bei 0,3 mM; +, sofern nicht anders angegeben

Bitterstoffe	Konzentration [mM] ⁺	102	103	105	108	109	114	115	118	119	120	131	136	138	140	143	144	Σ
Absinthin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
Acesulfam K	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Acetylpyrazin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Allylisothiocyanat	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Aloin	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Amarogentin	1,00	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	3
D-Amygdalin	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Andrographolid	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Androsteron	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Arborescin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
Arbutin	30,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Arglabin	0,10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
Aristolochiasäure	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ascorbinsäure	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Atropin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Azathioprin	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Bacitracin	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Berberinchlorid	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Betain	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Biotin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Brucin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Campher	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2
β-Carotin	0,01	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Cascarellin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chinin	0,01	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	4
Chloramphenicol	0,30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
Chlorhexidin	0,3 μM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Chlorogensäure	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chloroquin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Chlorpheniramin	0,10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	3
Cnicin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Cobalamin	0,1 μM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Coffein	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Colchicin	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Cortison	0,003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Costunolid	0,03	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3
Coumarin	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0

Bitterstoffe	Konzentration [mM] ⁺	102	103	105	108	109	114	115	118	119	120	131	136	138	140	143	144	Σ
Creatinin	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Crotalin	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Cucurbitacin D	0,30	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Cucurbitacin E	0,10	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Cucurbitacin I	0,15	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Curcumin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Cycloheximid	1,00	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Denatoniumbenzoat	3,00	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	3
Denatonium-saccharid	3,00	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
Dicumarol	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Digitonin	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dimethylsulfon	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Diphenidol	0,01	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Docosahexaensäure	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Emetin	0,03	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	2
Epicatechin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Epigallocatechingallat	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Eriodictyol	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Erythromycin	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ethylpyrazin	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Falcarindiol	0,03	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Folsäure	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Genistein	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Genistin	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Ginkgolid A	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Helicin	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Humulon	0,003	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Indol-3-essigsäure	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Indol-3-carbinol	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Lidocain	0,03	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Limonin	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Naringin	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Natriumbenzoat	10,00	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Neohesperidin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Nicotin	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Noscapin	0,01	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Ouabain	3,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Pantothersäure	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Papaverin	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Parthenolid	0,10	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Phenanthrolin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Phenylethylisothiocyanat	0,03	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Phenyl-β-D-Glucose	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Phenylthiocarbamid	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Picrotin	1,00	-	-	+ *	-	-	+ *	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Picrotoxinin	1,00	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Pilocarpin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
5-Propyl-2-thiouracil	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	1
6-Propyl-2-thiouracil	1,00	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	3
Progesteron	0,003	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Pyridoxin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Pyrocatechin	1,00	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2
Quassin	0,30	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Bitterstoffe	Konzentration [mM] ⁺	102	103	105	108	109	114	115	118	119	120	131	136	138	140	143	144	Σ
Resveratrol	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Riboflavin	0,01 µM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
D-Salicin	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Salicylsäure	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Santonin	0,10	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
Sinigrin	1,00	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Solanidin	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
α-Solanin	0,001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Sparteïn	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Strychnin	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	1
Sucroseoctaacetat	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
L-Sulforaphan	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Tanninsäure	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Tatridin A	0,30	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Tatridin B	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Taurin	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Taurocholsäure	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
Theobromin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Theophyllin	10,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Thiamin	1,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
α-Thujon	0,30	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	2
Trigonellin	0,30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Xanthotoxin	0,10	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	3
Yohimbin	0,30	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	**	-	+	4

Der Bitterrezeptor Tas2r119 wurde durch die Geschmacksstoffe Arborescin, Argabin, Campher, Chloramphenicol, Costunolid, α-Thujon und Xanthotoxin aktiviert. Arborescin und α-Thujon aktivierten Tas2r119 mit einem EC₅₀-Wert von 0,03 ± 0,01 mM bzw. 0,08 ± 0,02 mM. Die Bittersubstanzen Costunolid, PROP und Xanthotoxin bedingten die Ausschüttung von Ca²⁺ im *In-vitro*-System bei HEK293T-Zellen, die transient den Bitterrezeptor Tas2r120 exprimierten. Der Schwellenwert für die Detektion der Ca²⁺-Ausschüttung lag bei 0,01 mM für Costunolid, 0,3 mM für PROP bzw. 0,03 mM für Xanthotoxin. Letzterer Bitterstoff bedingte die stärkste Aktivierung des Rezeptors (Abb. 4.3). Tas2r138 wurde durch die Stoffe 5-Propyl-2-thiouracil und Yohimbin aktiviert. Weiterhin konnte Tas2r140 durch sechs Bitterstoffe – Absinthin, Chininsulfat, Chlorpheniramin, Denatoniumbenzoat, Emetin und Strychnin – stimuliert werden, mit der umfangreichsten Ca²⁺-Ausschüttung nach Applikation von Strychnin und Denatoniumbenzoat. Der Rezeptor Tas2r144 konnte durch 16 natürliche und synthetische Bitterstoffe aktiviert werden. Unter ihnen Substanzen wie Chlorhexidin, Colchicin, Epicatechin, Epigallocatechingallat (EGCG), Ethylpyrazin, Ouabain, Papaverin und Taurocholsäure, die ausschließlich Tas2r144-transfizierte Zellen stimulierten. Andere Aktivatoren waren Amarogentin, Campher, Chlorpheniramin, Denatoniumbenzoat und -saccharid, Pyrocatechin und Yohimbin. Im Rahmen ihrer maximal verwendbaren Konzentrationen konnten die stärksten Aktivierungen für Tas2r144-transfizierte HEK293T-Zellen nach Gabe von Colchicin, Taurocholsäure, Denatoniumsaccharid, Yohimbin und Chlorhexidin beobachtet werden (Abb. 4.4).

Den Geschmacksrezeptor Tas2r114 konnte mein Kollege Dr. Peng Shi bereits 2007 deorphanisieren und zeigen, dass dieser durch Cucurbitacin E aktiviert wird. In den von mir durchgeführten Experimenten konnten weitere Liganden (Cucurbitacin B, D und I, Picrotin, Picrotoxinin, Progesteron und Santonin) identifiziert werden (Abb. 4.2).

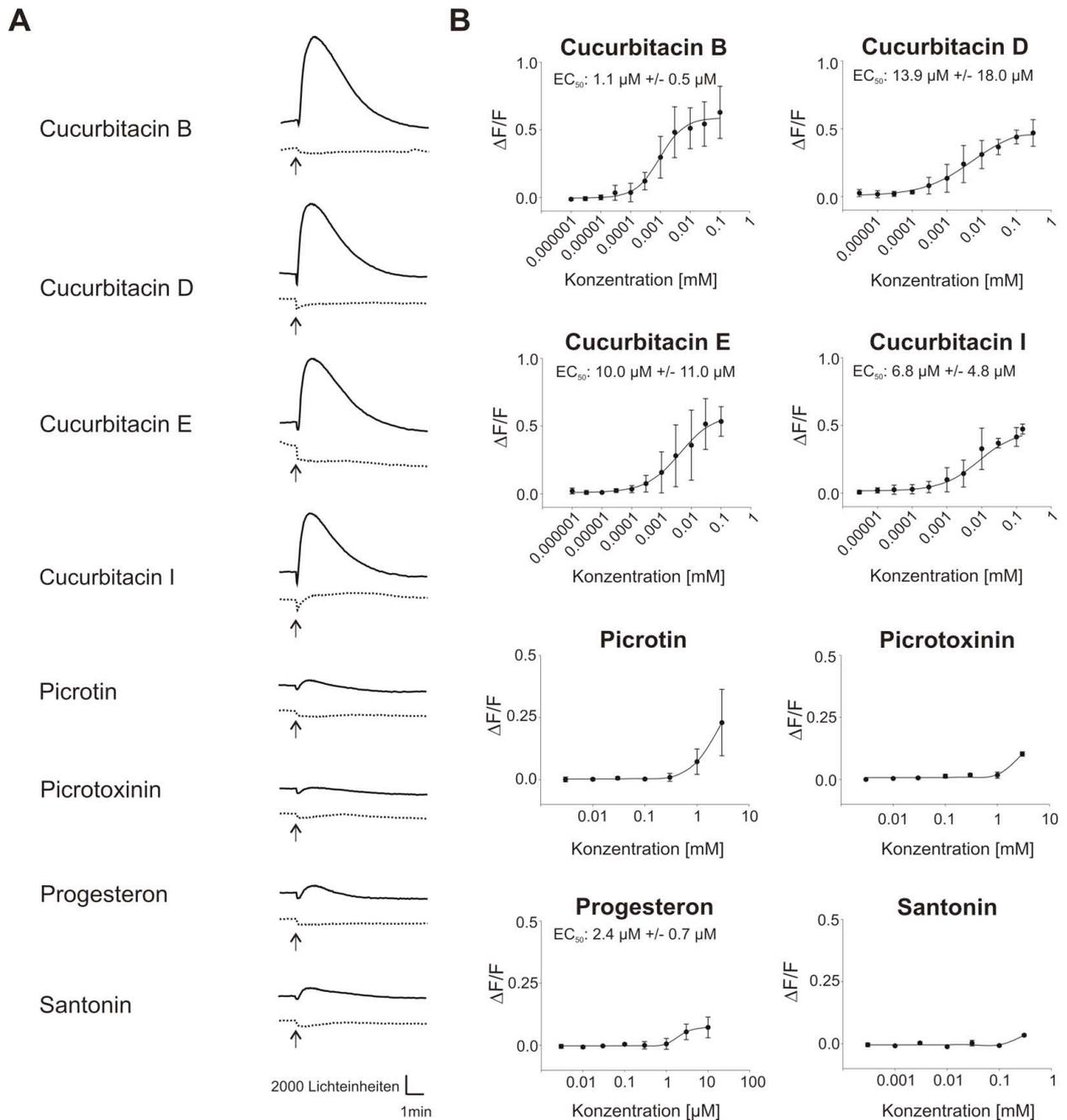
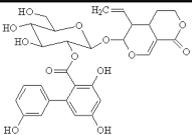
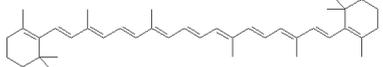
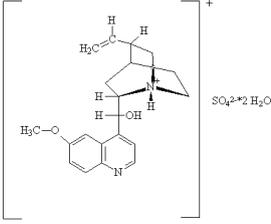
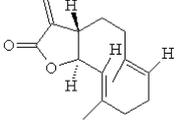


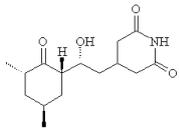
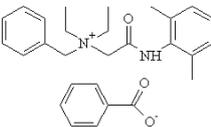
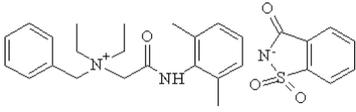
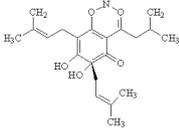
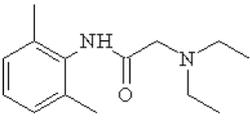
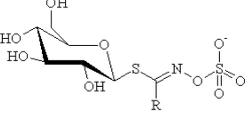
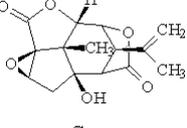
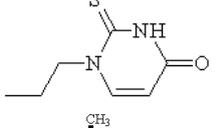
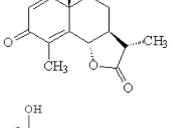
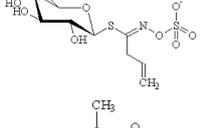
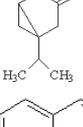
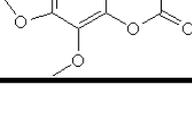
Abb. 4.2. Aktivoren des Bitterrezeptors Tas2r114. (A) FLIPR-Calcium-Signale Tas2r114-exprimierender Zellen (durchgehende Linie) und mit Leervektor transfizierter Zellen (gepunktete Linie) nach Stimulation mit verschiedenen Bitterstoffen in ihren höchsten applizierbaren Konzentrationen (Cucurbitacine 100 μM bzw. 300 μM, Picrotin 3 mM, Picrotoxinin 3 mM, Progesteron 3 μM und Santonin 0,3 mM). Pfeil: Applikation der Bitterstoffe. (B) Konzentrationsabhängige Aktivierung Tas2r114-exprimierender Zellen durch verschiedene Cucurbitacine, Picrotin, Picrotoxinin, Progesteron und Santonin. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

Die Cucurbitacine aktivierten Tas2r114 im *In-vitro*-System am stärksten (Abb. 4.3). In Abhängigkeit des Cucurbitacins wurden EC_{50} -Werte zwischen 1,1 μ M und 13,9 μ M beobachtet. Für Progesteron, das spezifisch nur eine Ca^{2+} -Ausschüttung von Tas2r114-transfizierten Zellen bewirkte, konnte ein EC_{50} -Wert von 2,4 μ M ermittelt werden. Picrotoxinin und Santonin aktivierten den Rezeptor bei einer Konzentration von 3 mM bzw. 0,3 mM, während Picrotin in einer Konzentration von 1 mM und 3 mM zu einer Freisetzung von Ca^{2+} im HEK293T-basierten Assay führte.

Mittels der hier dargelegten *Calcium-Imaging*-Experimente konnten ferner zusätzliche Liganden für Tas2r105 und Tas2r108 identifiziert werden, deren erste Liganden 2000 von der Arbeitsgruppe um Charles Zuker identifiziert wurden (Chandrashekar *et al.*, 2000). Für Tas2r105 konnten neben den bekannten Liganden Cycloheximid (Chandrashekar *et al.*, 2000) und Lidocain (Pronin *et al.*, 2004) 27 neue Bitterstoffe identifiziert werden (Tab. 4.2). Unter ihnen Bitterstoffe wie β -Carotin, Diphenidol, Falcarindiol, Humulon, Natriumbenzoat, Parthenolid, Phenylethylisothiocyanat (PEITC), Quassin, Sinigrin und Tatridin A, die ausschließlich Tas2r105-transfizierte Zellen aktivierten. Die ausgeprägtesten Ca^{2+} -Antworten konnten hierbei für Denatoniumsaccharid, Cycloheximid, Amarogentin, Denatoniumbenzoat, Lidocain und α -Thujon gemessen werden (Abb. 4.4). Für einzelne Substanzen, die in ausreichender Menge für die Erstellung von Dosis-Wirkungsbeziehungen verfügbar waren, wurden genauere Analysen zur Aktivierung des Rezeptors Tas2r105 vorgenommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

Tab. 4.2. Aktivierung von Tas2r105-exprimierenden Zellen durch Bitterstoffe. Der angegebene Schwellenwert ist die niedrigste Konzentration der Testsubstanz, die eine deutliche Stimulation Tas2r105-exprimierender Zellen hervorrief. Die Angabe eines EC_{50} -Wertes erfolgte alleinig bei Vorliegen einer Dosis-Wirkungsbeziehung im Sättigungsbereich. PEITC, Phenylethylisothiocyanat; PROP, 6-Propyl-2-thiouracil

Substanz	Struktur	Aktivierung von Tas2r105	
		Schwellenwert [μ M]	EC_{50} [μ M]
Amarogentin		0,3	3,9 \pm 3,5
β -Carotin		1,0	-
Chinin		0,3	-
Costunolid		10,0	13,8 \pm 7,3

Substanz	Struktur	Aktivierung von Tas2r105	
		Schwellenwert [μM]	EC_{50} [μM]
Cycloheximid		0,01	$0,3 \pm 0,2$
Denatoniumbenzoat		100,0	$342,1 \pm 103,0$
Denatoniumsaccharid		30,0	$854,5 \pm 118,5$
Falcarindiol		10,0	-
Humulon		0,3	-
Lidocain		10,0	-
PEITC		30,0	-
Picrotoxinin		300,0	$308,5 \pm 14,2$
PROP		100,0	-
Santonin		100,0	-
Sinigrin		1000,0	-
α -Thujon		30,0	$204,3 \pm 92,2$
Xanthotoxin		10,0	-

Für Tas2r108 konnten neben PROP (Chandrashekar *et al.*, 2000) sechs weitere Liganden ermittelt werden. Noscadin aktivierte rezeptorspezifisch ausschließlich Tas2r108-transfizierte Zellen. Weiterhin wurde eine Ca²⁺-Ausschüttung Tas2r108-transfizierter Zellen nach Applikation von Amarogentin, Chinin, Chlorpheniramin und Yohimbin beobachtet. Die Identifizierung eines Liganden – im Rahmen der maximal verwendbaren Konzentrationen – für Tas2r102, Tas2r103, Tas2r109, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r131, Tas2r136 und Tas2r143 blieb ohne Erfolg. Trotz der immunocytochemisch nachweisbaren Expression der Rezeptoren in der Zellmembran (vgl. Abb. 4.1) blieben diese Rezeptoren weiterhin *orphan*.

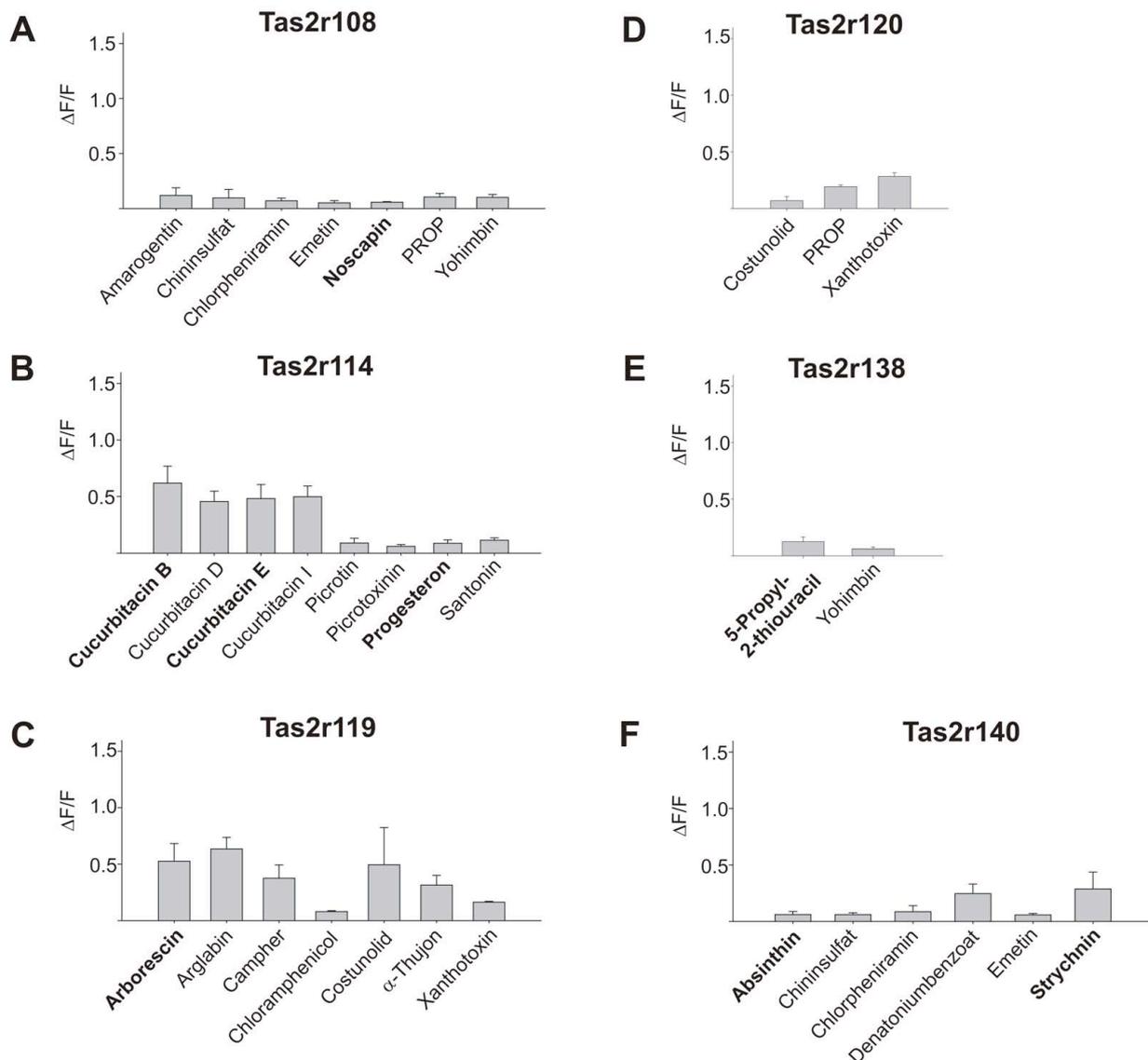


Abb. 4.3. Fluoreszenzsignale von Bitterrezeptoren der Maus. Durchschnittliche FLIPR-Calcium-Fluoreszenzsignale nach Applikation positiv identifizierter Agonisten von Tas2r108- (A), Tas2r114- (B), Tas2r119- (C), Tas2r120- (D), Tas2r138- (E), Tas2r140-exprimierenden Zellen (F) nach Normalisierung auf mit Leervektor transfizierten Zellen (n = 2 - 5). Substanzen, die die Aktivierung nur eines der 16 untersuchten Bitterrezeptoren bedingten, sind fett hervorgehoben. Cucurbitacin B wurde ausschließlich auf Tas2r114-transfizierte Zellen getestet, da bereits Cucurbitacin D, E und I zur Aktivierung des Rezeptors führten.

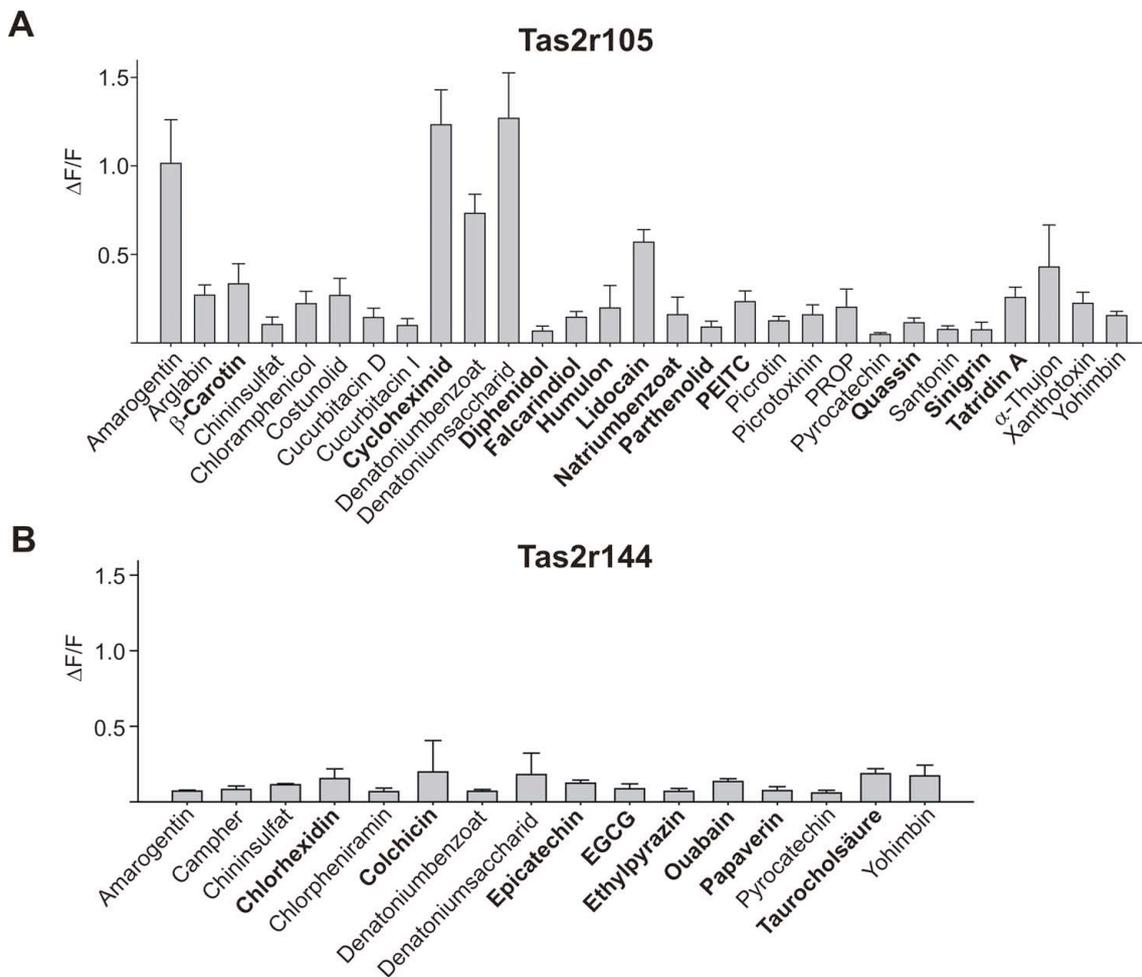


Abb. 4.4. Fluoreszenzsignale von Tas2r105- und Tas2r144-exprimierenden Zellen. Durchschnittliche FLIPR-Calcium-Fluoreszenzsignale nach Applikation positiv identifizierter Agonisten von Tas2r105- (A) und Tas2r144-exprimierenden Zellen (B) nach Normalisierung auf mit Leervektor transfizierten Zellen ($n = 2 - 6$). Substanzen, die die Aktivierung eines der 16 untersuchten Bitterrezeptoren bedingten, sind fett hervorgehoben.

Die Anzahl der Substanzen, die einen der hier betrachteten Bitterrezeptoren der Maus aktivierten, variierte folglich zwischen zwei (Tas2r138) und 29 (Tas2r105). Auf Grund der Ergebnisse kann eine grobe Einteilung der Rezeptoren entsprechend der Breite ihrer Aktivierungsspektren in eng, mittel und breit postuliert werden.

Zu den Rezeptoren mit einem engen Aktivierungsspektrum würde Tas2r120 und Tas2r138 zählen, die durch drei bzw. zwei der untersuchten 114 Liganden aktiviert wurden. Die Rezeptoren Tas2r108, Tas2r114, Tas2r119 und Tas2r140, die jeweils durch fünf bis sieben Agonisten pro Rezeptor aktiviert wurden, könnten der zweiten Gruppe mit einem mittleren Aktivierungsspektrum zugeordnet werden. Die Ca^{2+} -Ausschüttung der Tas2r114- und Tas2r119-transfizierten Zellen erfolgte dabei ausschließlich durch natürlichen Bitterstoffe, während Tas2r108 und Tas2r140 den Bittergeschmack von natürlichen und synthetischen Substanzen vermittelten. Den Bitterrezeptoren mit einem breiten Aktivierungsspektrum sind die Rezeptoren Tas2r144 und Tas2r105 zuzuordnen, für die 16 bzw. 29 Liganden identifiziert werden konnten. Die beiden Rezeptoren wurden durch 39 der 114 getesteten Substanzen – inklusive acht synthetischen Substanzen – stimuliert. Dies entspricht 34 % der untersuchten Verbindungen.

Offensichtliche strukturelle Gemeinsamkeiten bei den Liganden dieser beiden Rezeptoren lagen nicht vor.

Insgesamt aktivierten 47 (41 %) der getesteten Substanzen murine Bitterrezeptoren. 27 dieser Bitterstoffe (57 %) führten zur Aktivierung nur eines Bitterrezeptors, während 26 % der Bitterstoffe (12) die Aktivierung zweier Tas2rs bedingte. Die Geschmacksstoffe Amarogentin, Chlorpheniramin, Costunolid, Denatoniumbenzoat, PROP und Xanthotoxin aktivierten in den *Calcium-Imaging*-Experimenten drei und die Naturstoffe Chinin und Yohimbin vier der untersuchten Bitterrezeptoren der Maus. Bei Aktivierungen mehrerer Rezeptoren durch eine Substanz wurden zumeist Zellen, die mit Tas2r105-, Tas2r108-, Tas2r120-, Tas2r140- oder Tas2r144-Plasmiden transient transfiziert wurden, stimuliert.

Tab. 4.3. Aktivierbarkeit von 16 Tas2-Rezeptoren der Maus im Vergleich zu ihren humanen, orthologen Rezeptoren durch natürliche und synthetische Bitterstoffe. Vergleich der Aktivierbarkeit von transient transfizierten HEK293T-Gα16gust44-Zellen mit TAS2-Rezeptoren des Menschen und der Maus im Calcium-Imaging-System nach Stimulation mit diversen Bitterstoffen in ihrer maximal applizierbaren Konzentration. Dargestellt sind ausschließlich Substanzen aus der Analyse von 114 Bitterstoffen (siehe Tab. 4.1), die zur Aktivierung eines Rezeptors dieser Spezies führten. Die humanen Daten beruhen auf Meyerhof et al., 2010 und unpublizierten Ergebnissen der Abteilung Molekulare Genetik. +, Aktivierung; -, keine Aktivierung; PEITC, Phenylethylisothiocyanat

	Liganden pro Rezeptor																13	7	18	7	35	29	7	3	0	37	0	0	0	6	8	0	0	10	2	8	16	0	0	47	3	0
	Rezeptor		TAS2R4		TAS2R10		TAS2R13		TAS2R14		TAS2R15		TAS2R16		TAS2R38		TAS2R40		TAS2R42		hCluster		Tas2r120		Tas2r136																	
Bitterstoffe	TAS2R1	Tas2r119	TAS2R4	Tas2r108	TAS2R10	Tas2r105	Tas2r114	TAS2R13	Tas2r102	TAS2R14	Tas2r103	Tas2r109	Tas2r115	Tas2r140	TAS2R16	Tas2r118	Tas2r143	TAS2R38	Tas2r138	TAS2R40	Tas2r144	TAS2R42	Tas2r131	hCluster	Tas2r120	Tas2r136																
Absinthin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Acesulfam K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Allylisothiocyanat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-																
Aloin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Amarogentin	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-																
D-Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																
Andrographolid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Androsteron	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Arborescin	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																
Arglabin	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Aristolochiasäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Atropin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Azathioprin	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Berberinchlorid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Brucin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Campher	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-																
β-Carotin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																
Cascarellin	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Chinin	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-																
Chloramphenicol	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Chlorhexidin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-																
Chloroquin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																
Chlorpheniramin	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-																
Cnicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Coffein	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Colchicin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-																
Cortison	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-																
Costunolid	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-																
Coumarin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-																

Rezeptor	TAS2R														hCluster	Tas2r120	Tas2r136										
	TAS2R1	Tas2r119	TAS2R4	Tas2r108	TAS2R10	Tas2r105	Tas2r114	TAS2R13	Tas2r102	TAS2R14	Tas2r103	Tas2r109	Tas2r115	Tas2r140				TAS2R16	Tas2r118	Tas2r143	TAS2R38	Tas2r138	TAS2R40	Tas2r144	TAS2R42	Tas2r131	
Bitterstoffe																											
Cucurbitacin D	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+		
Cucurbitacin E	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Cucurbitacin I	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Cycloheximid	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Denatoniumbenzoat	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
Denatoniumsaccharid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	
Diphenidol	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	
Docosahexaensäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Emetin	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Epicatechin	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Epigallocatechingallat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
Erythromycin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ethylpyrazin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	
Falcarindiol	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Genistein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Helicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Humulon	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Lidocain	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Limonin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Natriumbenzoat	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Noscapin	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ouabain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Pantothensäure	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
Papaverin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Parthenolid	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
PEITC	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Phenyl-β-D-Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Phenylthiocarbamid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Picrotin	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Picrotoxinin	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
5-Propyl-2-thiouracil	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	
6-Propyl-2-thiouracil	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Progesteron	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Pyridoxin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Pyrocatechin	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Quassin	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Resveratrol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Santonin	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Sinigrin	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
Spartein	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Strychnin	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Sucroseoctaacetat	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Tanninsäure	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	
Tatridin A	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Tatridin B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Taurocholsäure	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Theobromin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Thiamin	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
α-Thujon	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Xanthotoxin	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Yohimbin	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	

Ein Vergleich der Bitterrezeptoren der Maus mit den humanen TAS2Rs hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit durch die 114 betrachteten Bittersubstanzen zeigte, dass 37 Bitterstoffe ausschließlich humane Rezeptoren aktivierten, jedoch keinen der untersuchten Mausezeptoren. Umgekehrt aktivierten die Bitterstoffe β-Carotin, Emetin und Ouabain im

In-vitro-System ausschließlich Bitterrezeptoren der Maus, aber keinen der 25 humanen TAS2Rs. Bei 44 der getesteten Bitterstoffe konnte eine Aktivierung von Bitterrezeptoren in beiden Spezies beobachtet werden, während 30 Substanzen weder Bitterrezeptoren des Menschen noch der Maus aktivierten.

Die Auswertung des Antwortverhaltens der 16 Bitterrezeptoren der Maus unter Berücksichtigung ihrer orthologen Beziehungen zu den humanen TAS2Rs zeigte, dass 82 der 114 analysierten Substanzen zur Aktivierung eines Bitterrezeptors in einer der beiden Spezies führten. Die Aktivierbarkeit der Rezeptoren gegenüber diesen 82 Bitterstoffen ist der Tab. 4.3 zu entnehmen.

Hierbei entfielen durchschnittlich auf jede orthologen Mensch-Maus-Beziehung 18 Aktivierungen auf den humanen Rezeptor und fünf Aktivierungen auf den murinen Rezeptor. In 10,1 % der Fälle konnte eine Übereinstimmung des Aktivierungsverhaltens von humanen Bitterrezeptoren im Vergleich zu ihren orthologen Mausrezeptoren beobachtet werden. *Tas2r105* und *Tas2r114* zeigten dabei mit 18 bzw. 7 identischen Liganden die größte Deckungsgleichheit an Aktivatoren zu ihrem orthologen Bitterrezeptor TAS2R10.

Eine ausbleibende Aktivierung eines Mausrezeptors bei Stimulation des humanen, orthologen Bitterrezeptors konnte 339-mal erfasst werden, dies entsprach einem Anteil von 81,5 % aller aktivierenden Substanzen. Umgekehrt konnte in 8,4 % der Fälle, dass heißt bei durchschnittlich zwei Bitterstoffen, eine Aktivierung eines Bitterrezeptors der Maus durch eine Substanz erfasst werden, die nicht den humanen, orthologen Rezeptor aktivierte. Letzteres traf auf alle Rezeptoren, für die ein Ligand identifiziert werden konnte, mit Ausnahme von *Tas2r114* zu. *Tas2r144* und *Tas2r105* wiesen hierbei mit zwölf bzw. elf Bitterstoffen die meisten Liganden auf, die nicht den zugehörigen Orthologen TAS2R40 bzw. TAS2R10 aktivierten.

Die größten Abweichungen zu den humanen Orthologen traten beim Vergleich von *Tas2r120*, der den humanen Rezeptoren TAS2R43 bis TAS2R50 ortholog ist, und *Tas2r140*, der ortholog zu TAS2R14 ist, auf. Hier konnten 46 bzw. 34 der untersuchten Bitterstoffe jeweils nur den Rezeptor einer Spezies aktivieren.

Folglich konnten im Zuge dieser Experimente viele Beispiele dafür gefunden werden, dass Bitterrezeptoren des Menschen, aber nicht die orthologen Rezeptoren der Maus, durch bestimmte Bitterstoffe aktiviert wurden, als auch umgekehrt. Weiterhin konnte lediglich in vereinzelt Fällen die Aktivierung von orthologen menschlichen und murinen Bitterrezeptoren durch identische Substanzen beobachtet werden (Abb. 4.5).

Zusammengefasst lässt sich daher festhalten, dass Bitterrezeptoren der Maus zumeist durch deutlich weniger und nur selten durch die identischen Bitterstoffe wie ihre humanen Gegenspieler aktiviert werden. Funktionelle Orthologe scheint es demnach im eigentlichen Sinne nicht zu geben.

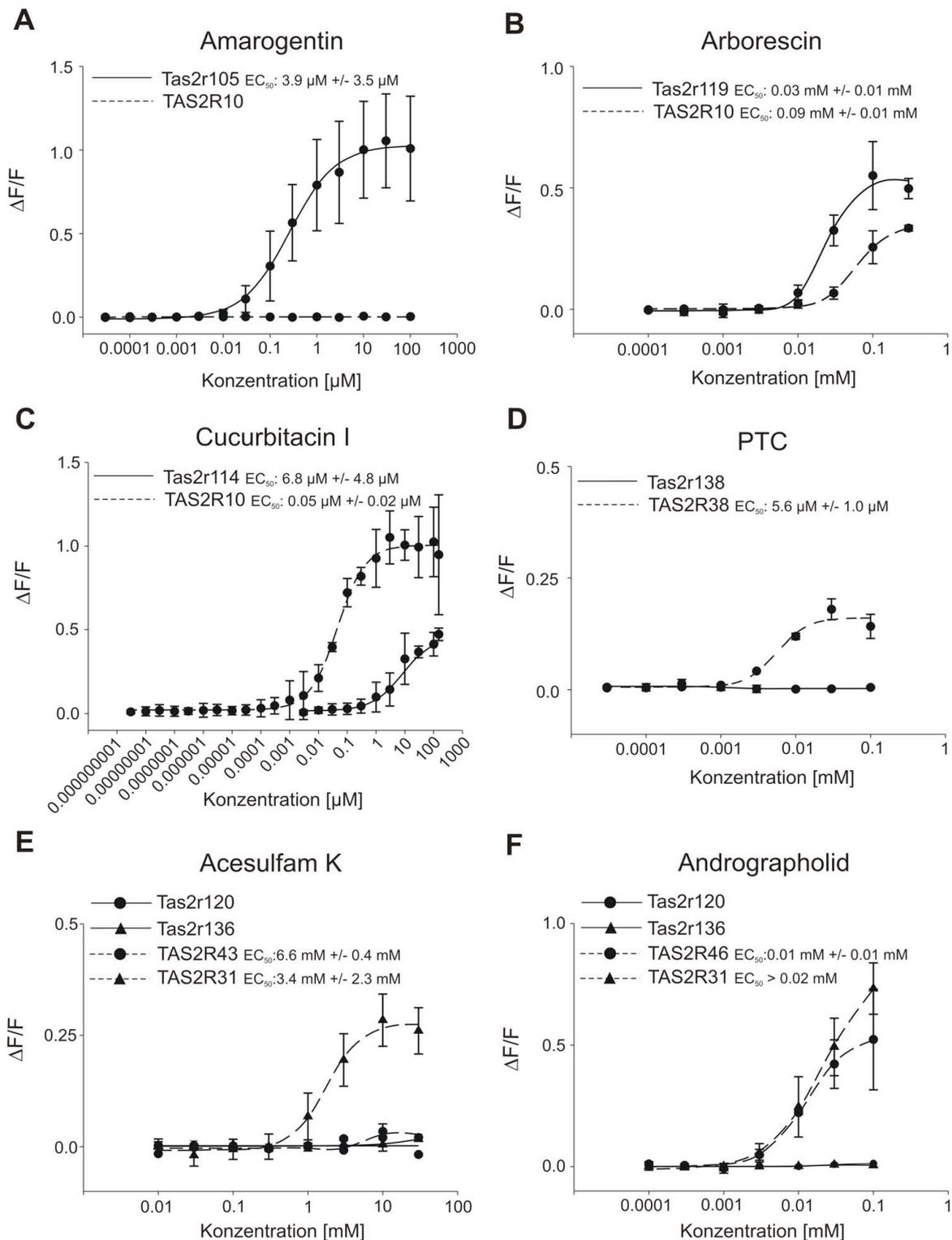


Abb. 4.5. Konzentrations-Wirkungsbeziehung ausgewählter Beispiele humaner und muriner Rezeptororthologe. (A) Konzentrationsabhängige Aktivierung von Tas2r105 durch Amarogentin bei ausbleibender Aktivierung des humanen, orthologen Bitterrezeptors. (B, C) Beispiel für die Aktivierung von murinen und humanen Bitterrezeptoren durch die selbe Substanz mit unterschiedlicher Sensitivität. (D) Konzentrationsabhängige Aktivierung von TAS2R38 durch Phenylthiocarbamid (PTC) bei ausbleibender Aktivierung des orthologen Mausbitterrezeptors. (E, F) Beispielhafte Aktivierung von Bitterrezeptoren des humanen Clusters bei fehlender Aktivierung der zwei orthologen Mausrezeptoren Tas2r120 und Tas2r136. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung aus zwei bis fünf unabhängigen Experimenten gezeigt.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von Opsinen durch elektrophysiologische Messungen an *Xenopus-laevis*-Oozyten

Zur funktionellen Charakterisierung der Opsine (humanes Rho, murines Opsin sws und mws) wurden elektrophysiologische Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik mit *Xenopus-laevis*-Oozyten durchgeführt. Die Expression der Opsine in An- oder Abwesenheit von Gustducin und PLC erlaubte festzustellen, ob Opsine an Gustducin koppeln und somit in der Lage sind, eine intrazelluläre Signalkaskade auszulösen. Ziel der Experimente sollte sein, herauszufinden, ob Opsine Geschmacksrezeptoren hinsichtlich ihrer G-Protein-Kopplung ersetzen und zur Aktivierung von Geschmacksrezeptorzellen nach Lichtstimulation führen können. Weiterhin sollten die optimalen Stimulationsbedingungen der Opsine näher untersucht werden.

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung von Opsinen in cRNA-injizierten *Xenopus-laevis*-Oozyten

Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* wurden entweder mit cRNA für Opsin, Opsin zuzüglich Gustducin und PLC oder Wasser injiziert und bei 16°C inkubiert. Die Applikation des 11-*cis*-Retinal-haltigen Messpuffers 5 min nach Start der Aufzeichnung der Stromkurven bedingte keine Änderung des basalen Stromes. Die 30 min später erfolgte Lichtstimulation führte demgegenüber bei einem großen Anteil Opsin-exprimierender Oozyten zirka 10 s bis 30 s nach Stimulusbeginn zu Auswärtsströmen (20 nA bis mehrere μ A), die meist nach wenigen Minuten (durchschnittlich 4 min bis 6 min) trotz anhaltender Belichtung wieder zum Ausgangsniveau zurückkehrten (Abb. 4.6). Wurden ausschließlich die Oozyten betrachtet, die neben den Opsinen auch Gustducin und PLC exprimierten, so zeigten 89 % bis 100 % einen auswärtsgerichteten Strom nach Lichtstimulation bei konstanter Klemmspannung. Demgegenüber reagierte bei den ausschließlich mit Opsin injizierten Oozyten nur jede zweite (sws und mws) bis dritte (Rho) auf die Lichtapplikation (Tab. 4.4).

Die maximalen Signalamplituden der lichtaktivierten Oozyten unterlagen dabei großen Variationen, auch wenn diese aus dem Ovar desselben Frosches stammten und mit der gleichen cRNA injiziert wurden. Im Mittel zeigten die Oozyten, die mit Opsin mws und Rho injiziert wurden, größere Stromänderungen nach Stimulation mit Licht (durchschnittlich 374 ± 296 nA und 466 ± 317 nA), als die Opsin-sws-exprimierenden Oozyten (im Mittel 225 ± 87 nA). Darüber hinaus wurde deutlich, dass die Oozyten, die mit Opsin, Gustducin und PLC koinjiziert wurden, durchschnittlich höhere (anderthalbfache bis fünffache, Tab. 4.4) maximale Signalamplituden zeigten, als die, die nur Opsin exprimierten. Bedingt durch die großen Schwankungen waren die mittleren Variationen der Signalamplituden allerdings oft nicht signifikant (Abb. 4.6 B, D, F). Jedoch zeigten jene Oozyten, wie unten ausgeführt, häufiger Stromänderungen als Folge des Lichtstimulus. Die DEPC-Wasser-injizierten Oozyten hingegen wiesen keine Veränderungen der Stromkurven nach Lichtstimulus auf. In Tab. 4.4 sind die Änderungen der Stromstärke nach Belichtung der Oozyten zusammengefasst. Abb. 4.6 zeigt

die dazugehörigen Boxplots für die verschiedenen Opsine. Repräsentative Stromkurven sind der Abb. 4.7 zu entnehmen.

Tab. 4.4. Anzahl und Angaben zur Stärke der Reaktion von cRNA- beziehungsweise DEPC-Wasser-injizierten *Xenopus*-Oozyten auf einen Lichtstimulus. Die Belichtung der Oozyten erfolgte nach 35 min Dunkelheit und einer halbstündigen Inkubation in 11-*cis*-Retinal-haltigem Puffer. Oozyten, die Rhodopsin (Rho) oder Opsin mws (medium wavelength sensitive) exprimierten, wurden mit Weißlicht und Oozyten, die mit Opsin sws (short wavelength sensitive) injiziert wurden, mit UV-Licht (312 nm) stimuliert. Gust, Gustducin; H₂O, Wasser; MW, Mittelwert; PLC, Phospholipase C β 2; STABW, Standardabweichung

	analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
	Oozyten	MW [μ A]	STABW [μ A]	Oozyten	MW [μ A]	STABW [μ A]	
Rho + Gust + PLC	18	0,685	0,932	16	0,768	0,944	89 %
Rho	13	0,166	0,262	4	0,466	0,317	31 %
mws + Gust + PLC	13	1,841	1,513	13	1,841	1,513	100 %
mws	10	0,199	0,271	5	0,374	0,296	50 %
sws + Gust + PLC	15	0,449	0,568	15	0,449	0,568	100 %
sws	13	0,128	0,117	6	0,225	0,087	46 %
H ₂ O	16	0,015	0,012	0	-	-	0 %

Neben den Analysen mit 11-*cis*-Retinal wurden weiterhin vereinzelt Experimente mit belichtetem 11-*cis*-Retinal bzw. all-*trans*-Retinal durchgeführt. Hierfür wurden Oozyten, die mit Rho oder Opsin mws, Gustducin und PLC koinjiziert wurden, in der Messkammer für 30 min mit über 1 h belichtetem 11-*cis*-Retinal oder all-*trans*-Retinal umspült. Diese Versuche ergaben, dass bei Exposition der Oozyten mit Weißlicht in der Mehrzahl der Fälle Auswärtsströme zu detektieren waren. Diese traten im identischen zeitlichen Fenster wie die Stromänderungen bei 11-*cis*-Retinal-inkubierten Oozyten auf (Abb. 4.8). Während die Häufigkeit, mit der die Oozyten auf einen Lichtstimulus reagierten, von der Art des Retinals unabhängig zu sein schien, fielen die Signalamplituden jedoch bei den mit belichtetem 11-*cis*-Retinal bzw. all-*trans*-Retinal inkubierten Oozyten im Mittel geringer aus (Tab. 4.5). Die Variationen der Signale in Abhängigkeit des Retinals erreichte jedoch keine statistische Signifikanz.

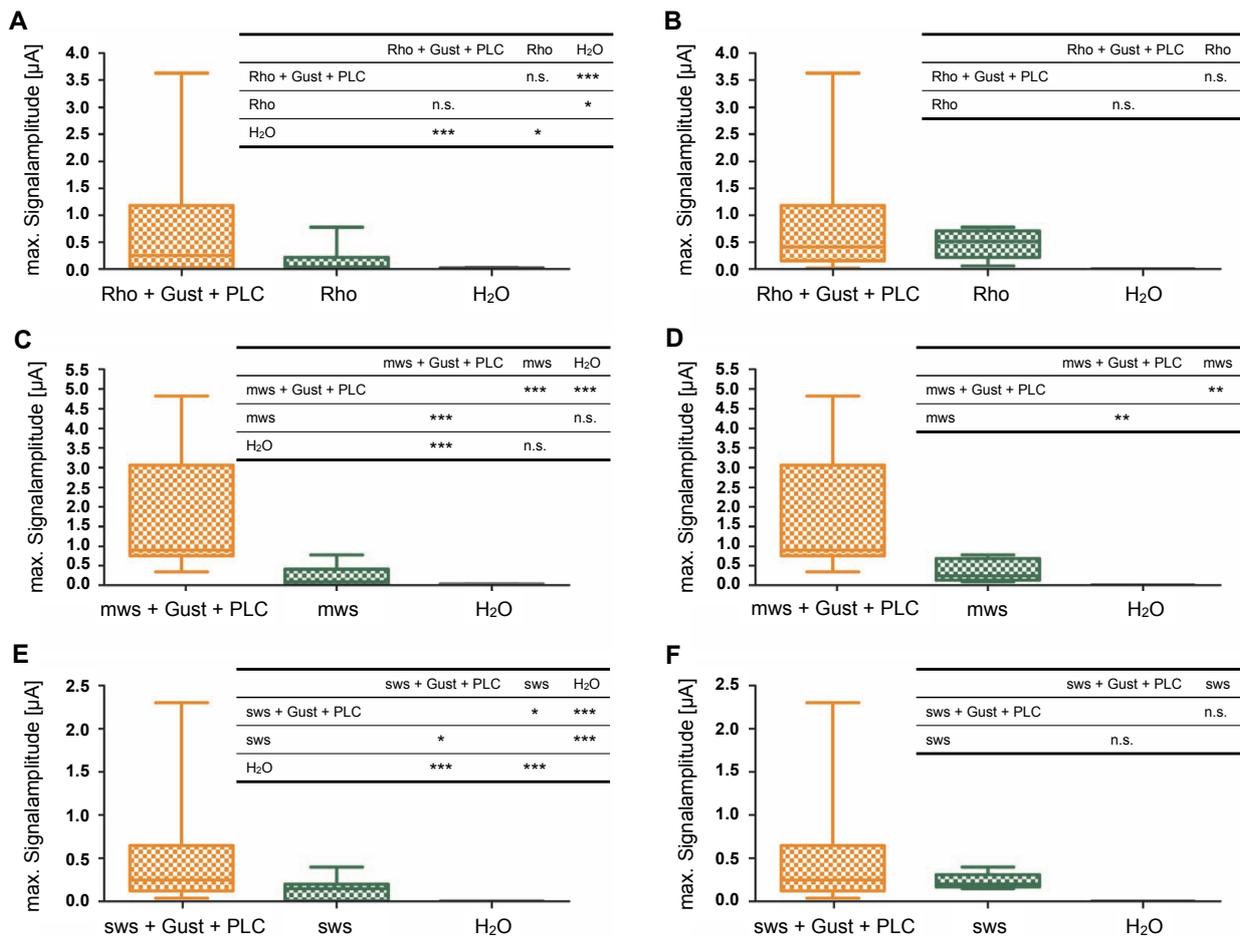


Abb. 4.6. Boxplots der cRNA- bzw. Wasser-injizierten Oozyten nach einmaliger Lichtstimulation. Die Box umfasst den Bereich vom ersten bis dritten Quartil mit einer Linie, die den Median widerspiegelt (2. Quartil). Die Fühler (Whisker) über und unter der Box repräsentieren die maximalen beziehungsweise minimalen gemessenen Werte für die maximalen Signalamplituden nach Stimulation der Oozyten mit Licht. Rhodopsin- (Rho) und Opsin-mws-(medium wavelength sensitive)-exprimierende Oozyten wurden hierfür nach 30 min Inkubation in 11-cis-Retinal-haltigem Puffer mit Weißlicht stimuliert, während Oozyten, die mit Opsin sws (short wavelength sensitive) injiziert wurden, UV-Licht (312 nm) ausgesetzt wurden. Die Boxplots (A), (C) und (E) zeigen die Daten für alle analysierten Oozyten, d. h. reagierende und nicht-reagierende Oozyten, welche mit Rho (A), Opsin mws (C) und Opsin sws (E) mit oder ohne α -Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC) injiziert wurden. (B), (D), und (F) stellen die Boxplots der lichtaktivierten Oozyten dar, die nach Inkubation mit 11-cis-Retinal auf Licht entsprechender Wellenlänge mit einem Auswärtsstrom reagiert haben. (B) zeigt die Oozyten, die mit Rho injiziert wurden, während (D) die Oozyten mit Opsin mws und (F) die Xenopus-Oozyten mit dem Opsin sws der Maus, jeweils mit und ohne den Komponenten der Geschmackskaskade koinjiziert, zeigt. Die Injektion von Wasser bedingte bei keiner Oozyte eine Reaktion auf Licht. Die statistische Auswertung erfolgte über den Kruskal-Wallis-Test und eine Post-Hoc-Analyse mit dem Dunnnett-T3-Test. max., maximale; n.s., nicht signifikant; *, $\alpha \leq 0,05$; **, $\alpha \leq 0,01$; ***, $\alpha \leq 0,001$

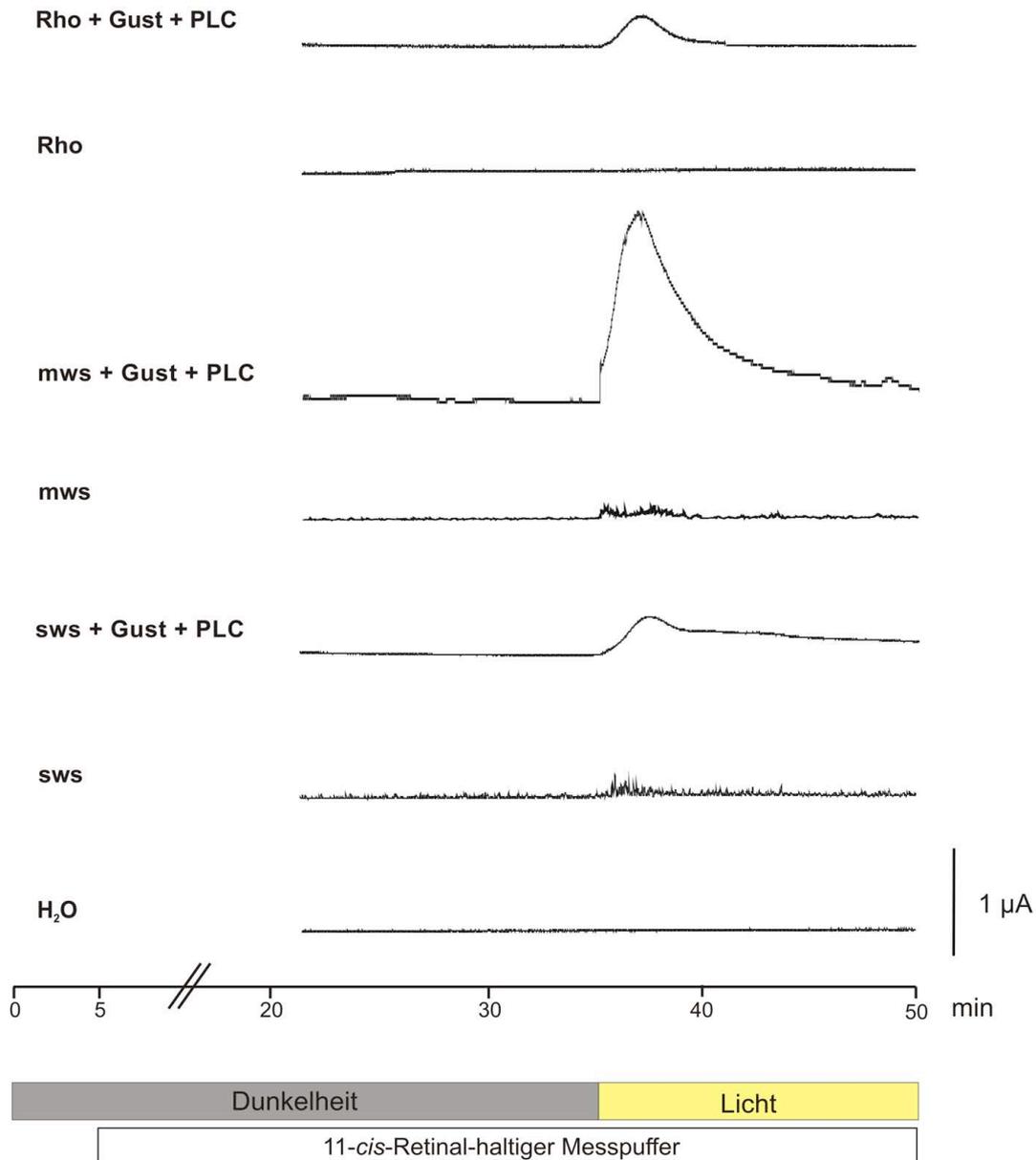


Abb. 4.7. Repräsentative Stromkurven von cRNA- bzw. Wasser-injizierten Oozyten nach einmaliger Lichtstimulation. Drei bis vier Tage nach der Injektion mit cRNA bzw. H₂O wurden die Oozyten mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik vermessen. Hierfür wurden die Oozyten auf ein Haltepotential von 0 mV fixiert und kontinuierlich (5 min nach Start der Messung) mit 11-cis-Retinal-haltigem Messpuffer umspült. 30 min nach Start der Retinal-Inkubation in Dunkelheit wurden die Oozyten bis zum Ende der Messung mit Weißlicht (Rho, mws,) bzw. UV-Licht von 312 nm (sws,) exponiert. Rho, Rhodopsin; mws, Opsin medium wavelength sensitive; sws, Opsin short wavelength sensitive; Gust, Gustducin; PLC, Phospholipase C β 2; H₂O, Wasser

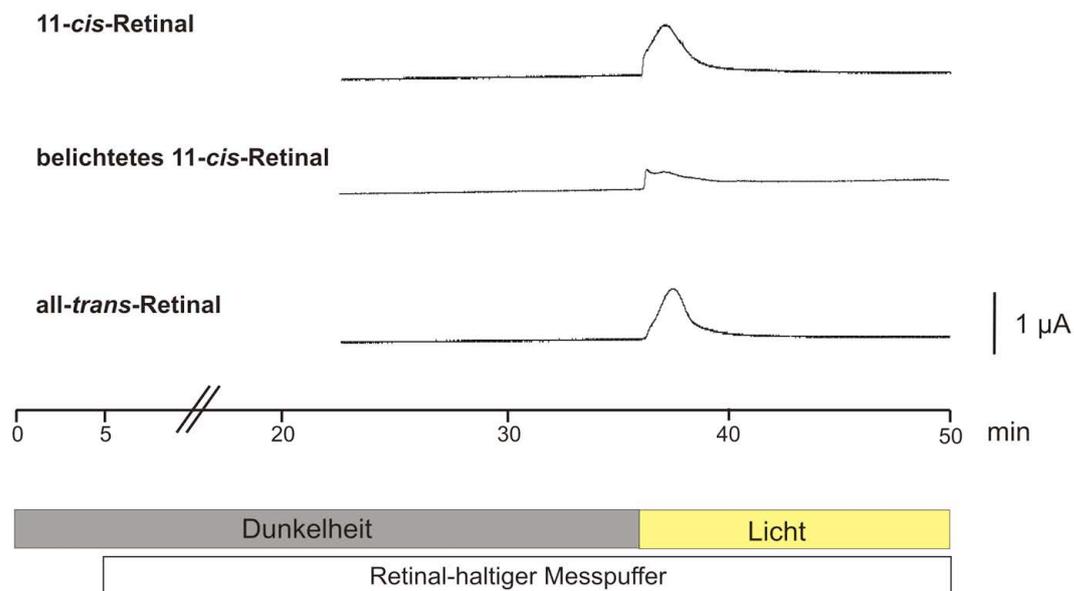


Abb. 4.8. Repräsentative Stromkurven von Opsin-mws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten *Xenopus*-Oozyten nach Inkubation mit verschiedenen Kofaktoren (Retinalen). Die Oozyten wurden auf ein Haltepotential von 0 mV fixiert und kontinuierlich (5 min nach Start der Messung) mit 11-*cis*-Retinal-, belichtetem 11-*cis*-Retinal- und all-*trans*-Retinal-haltigem Messpuffer umspült. Nach 30 min Inkubation mit dem jeweiligen Retinal in Dunkelheit wurden die Oozyten mit Weißlicht stimuliert. mws, medium wavelength sensitive

Tab. 4.5. Anzahl und Angaben zur Stärke der Lichtreaktion von Opsin/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten *Xenopus*-Oozyten bei unterschiedlichen Retinal-Kofaktoren. Die Oozyten wurden drei bis vier Tage nach Injektion der cRNA mit der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmtechnik vermessen. Die Belichtung nach 30 min Inkubation mit 11-*cis*-Retinal, belichtetem 11-*cis*-Retinal oder all-*trans*-Retinal mit Weißlicht führte zu den nachfolgend aufgeführten Stromänderungen. Betrachtet wurden Oozyten, die neben Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC) mit Rhodopsin (Rho) oder Opsin mws (medium wavelength sensitive) injiziert wurden. MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung

	analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
	Oozyten	MW [μ A]	STABW [μ A]	Oozyten	MW [μ A]	STABW [μ A]	
Rho + Gust + PLC							
11- <i>cis</i> -Retinal	18	0,685	0,932	16	0,768	0,944	89 %
belichtetes 11- <i>cis</i> -Retinal	7	0,185	0,342	4	0,312	0,429	57 %
all- <i>trans</i> -Retinal	5	0,259	0,303	4	0,312	0,321	80 %
mws + Gust + PLC							
11- <i>cis</i> -Retinal	13	1,841	1,513	13	1,841	1,513	100 %
belichtetes 11- <i>cis</i> -Retinal	3	0,626	0,536	3	0,626	0,536	100 %
all- <i>trans</i> -Retinal	2	0,494	0,556	2	0,494	0,556	100 %

Damit ist gezeigt, dass die lichtabhängige Aktivierung der Opsine nicht nur bei Inkubation von 11-*cis*-Retinal, sondern auch bei Inkubation von belichtetem 11-*cis*- und all-*trans*-Retinal auftrat.

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung von Opsinen in Poly(A)-injizierten *Xenopus-laevis*-Oozyten

Um die Interaktion zwischen den Opsinen und dem G-Protein Gustducin zu belegen, wurden neben den cRNA-Experimenten Versuche mit Poly(A)-RNA aus murinen Augen (angereichertes Retina-Pigmentepithel mit Choroidea; siehe 3.6.5) durchgeführt.

Dabei wurde jeweils ein Teil der extrahierten Poly(A)-RNA in cDNA umgeschrieben und einer genspezifischen Expressionsanalyse unterzogen. Diese ergab, dass PCR-Fragmente der erwarteten Größe für Rho (261 bp), Opsin mws (289 bp), Opsin sws (400 bp), Transducin (448 bp), Gustducin (773 bp) und PLC (331 bp) detektiert werden konnten. Die Identität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzanalysen bestätigt. Die injizierte Poly(A)-RNA enthielt folglich unter anderem mRNAs, welche für Rho, Opsin mws und sws, Transducin, Gustducin und PLC kodierten (Abb. 4.9).

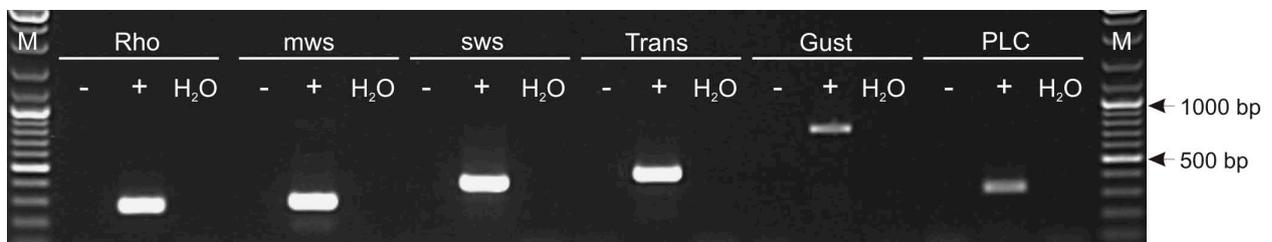


Abb. 4.9. PCR-Analyse von Poly(A)-RNA auf cDNA-Ebene. Nach Anreicherung von Poly(A)-RNA via Oligo(dT)-Cellulose-Chromatographie aus Gesamt-RNA des Retina-Pigmentepithel mit Choroidea wurden 0,25 µg Poly(A)-RNA nach einem DNase-Verdau in cDNA in An- (+RT) und Abwesenheit (-RT) von reverser Transkriptase umgeschrieben. Diese wurde als Matrize für die PCR mit Rhodopsin- (Rho), Opsin medium wavelength sensitive- (mws), Opsin short wavelength sensitive- (sws), Transducin- (Trans), Gustducin- (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC)-spezifischen Primern der Maus eingesetzt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden nachfolgend mittels Agarosegelelektrophorese getrennt. Die Amplifikation bedingte für alle Primerkombinationen eine genspezifische Bande. Die beobachteten PCR-Produkte konnten bis auf Ausnahme von Gustducin (2 µl Template) bereits bei Einsatz von 1 µl Poly(A)-cDNA nachgewiesen werden. Eine Amplifikation in der -RT wurde in keinem PCR-Ansatz detektiert. (1) Rho, 261 bp; (2) Opsin mws, 289 bp; (3) Opsin sws, 400 bp; (4) Transducin, 448 bp; (5) Gustducin, 773 bp und (6) PLC, 331 bp.

Die Injektion von Poly(A)-RNA allein führte nur in 13 % der Versuche zu Veränderungen der Membranströme als Reaktion auf Licht (Tab. 4.6). Auch die maximalen Signalamplituden der signalgebenden Poly(A)-injizierten Oozyten fielen mit 118 ± 73 nA signifikant geringer aus, als die der Oozyten, die neben Poly(A)-RNA mit Rho koinjiziert wurden (im Mittel 405 ± 225 nA; Abb. 4.10 und Tab. 4.6). Die Koinjektion von Poly(A)-RNA und Rho bedingte weiterhin deutlich häufiger eine Reaktion auf den Stimulus. 92 % der analysierten Poly(A)/Rho-Oozyten zeigten Auswärtsströme als Antwort auf die Applikation von Licht. Ein fast genauso hoher Anteil (95,5 %) an Poly(A)-Oozyten, die neben Rho Gustducin und PLC exprimierten, reagierten mit einem auswärtsgerichteten Stromfluss auf den Lichtstimulus. Dieser war hochsignifikant (durchschnittlich $1,8 \pm 1,8$ µA; Tab. 4.6). Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen der *Xenopus-laevis*-Oozyten, die mit Rho injiziert wurden, so wird deutlich, dass beträchtlich mehr Poly(A)-/Rho-koinjizierte Oozyten auf den Lichtstimulus mit einem Auswärtsstrom reagierten

(31 % kontra 92 %). Die maximalen Signalamplituden der beiden Oozytentypen [Rho kontra Rho mit Poly(A)] hingegen variierten mit 466 ± 317 nA gegenüber 405 ± 225 nA nicht signifikant. Anders verhielt es sich bei den Rho-Oozyten, die zusätzlich Gustducin und PLC exprimierten. Hier reagierten vergleichbar viele Rho/Gustducin/PLC-injizierte Oozyten wie ihre Poly(A)-Gegenspieler (etwa 93 % der analysierten Oozyten). Diese wiesen allerdings hochsignifikant höhere Signalamplituden nach Lichtstimulus auf ($0,8 \pm 0,9$ μ A kontra $1,8 \pm 1,8$ μ A).

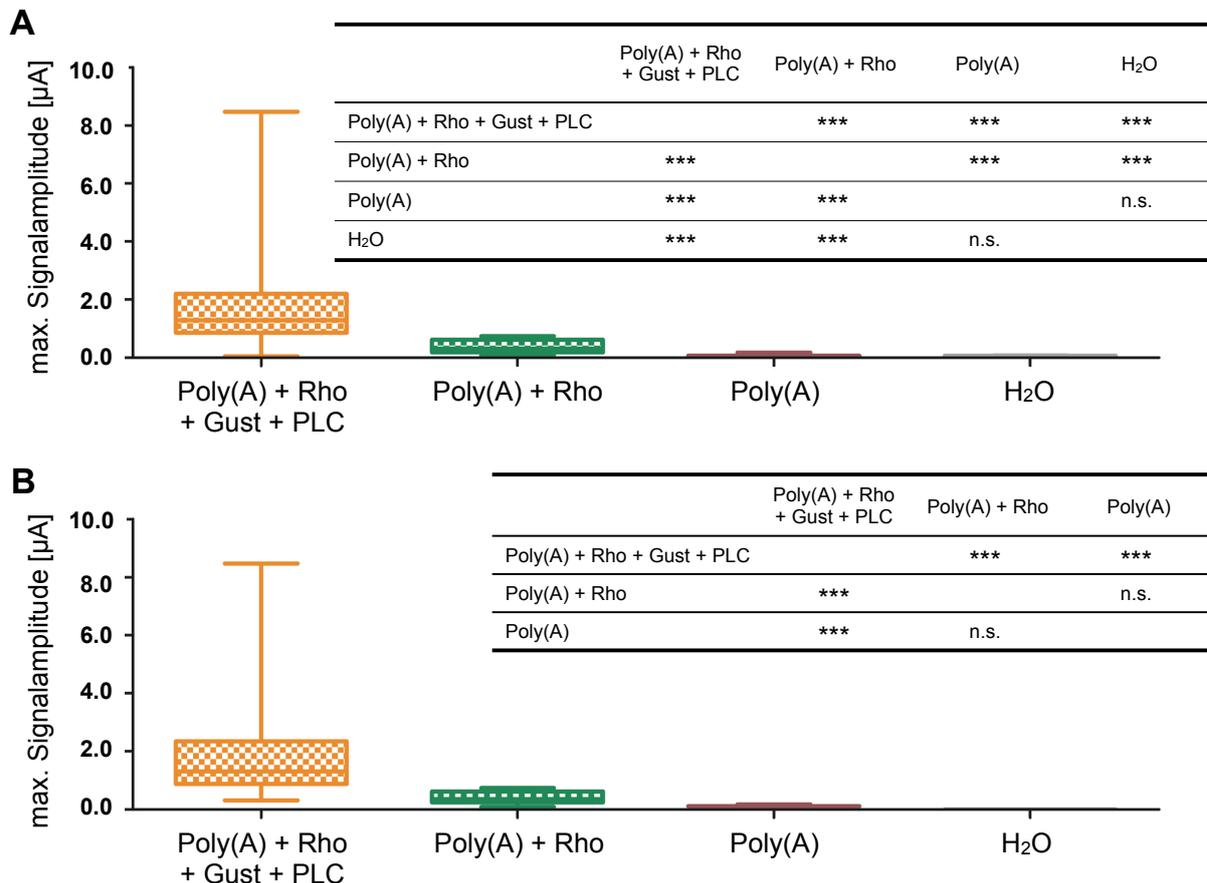


Abb. 4.10. Boxplots der Poly(A)-injizierten *Xenopus laevis*-Oozyten. Dargestellt sind Boxen, die den Bereich des ersten bis dritten Quartils umfassen mit einer Linie, die den Median wiedergibt (2. Quartil). Die Whisker (Fühler) über und unter der Box repräsentieren die maximalen beziehungsweise minimalen gemessenen Werte für die maximale Signalamplitude nach Stimulation der Oozyten mit Weißlicht. Die Boxplots in (A) repräsentieren Daten aller analysierten Oozyten, d. h. reagierender und nicht-reagierender Oozyten, welche mit dem humanem Rhodopsin (Rho), Poly(A)-RNA, α -Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC), mit Rho und Poly(A)-RNA oder mit Poly(A)-RNA allein beziehungsweise Wasser (H₂O) injiziert wurden. (B) zeigt die Daten der Oozyten, die wie in (A) mit Poly(A)-RNA und mit oder ohne cRNA koinjiziert wurden, beschränkt sich aber auf die Oozyten, die nach Inkubation mit 11-cis-Retinal auf Licht mit einem Auswärtsstrom reagiert haben. Die Wasser-injizierten Oozyten reagierten zu keinem Zeitpunkt auf den Lichtstimulus. Die statistische Auswertung erfolgte über den Kruskal-Wallis-Test und eine Post-Hoc-Analyse mit dem Dunnett-T3-Test. max., maximale; n.s., nicht signifikant; *, $\alpha \leq 0,05$; **, $\alpha \leq 0,01$; ***, $\alpha \leq 0,001$

Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen der Poly(A)-injizierten Oozyten zeigten, dass Poly(A)-RNA (inklusive des retinaspezifischen G-Proteins Transducin) alleine keine signifikanten Reaktionen auf Lichtapplikationen hervorrief. Durch Koinjektionen mit der funktionellen cRNA für Rho beziehungsweise Rho/Gustducin/PLC wurde diese Reaktionshäufigkeit potenziert.

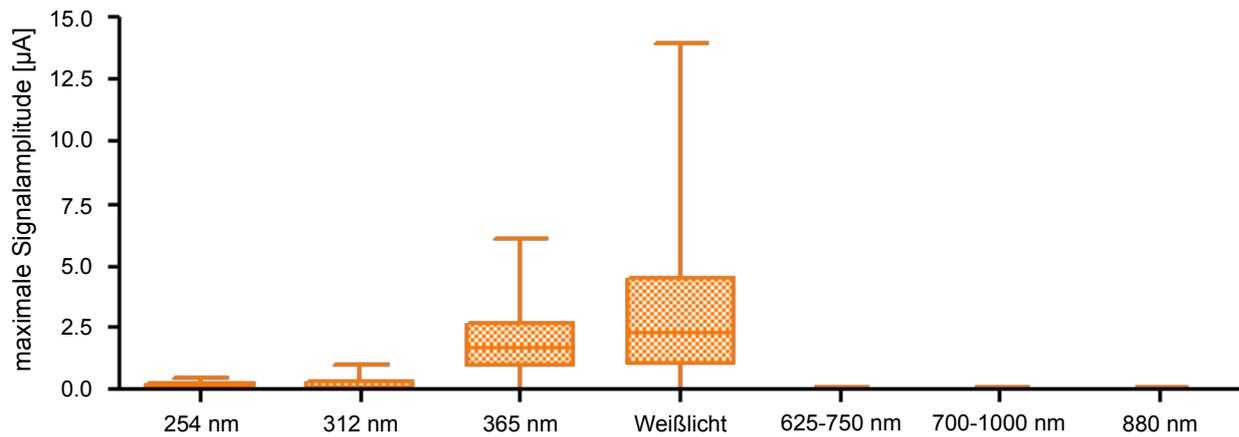
Tab. 4.6. Anzahl und Angaben zum Umfang der Lichtreaktion von Poly(A)/cRNA-injizierten Oozyten. Oozyten des *Xenopus laevis* wurden mit Poly(A)-RNA allein oder mit Poly(A)-RNA nebst cRNA von Rhodopsin (Rho) und Rho, Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC) injiziert. Nach 30 min 11-*cis*-Retinal-Inkubation in Dunkelheit wurden die Oozyten mit Weißlicht belichtet. Als Kontrolle kamen Wasser-injizierte (H₂O) Oozyten zum Einsatz. MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung

	analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
	Oozyten	MW [μ A]	STABW [μ A]	Oozyten	MW [μ A]	STABW [μ A]	
Poly(A) + Rho + Gust + PLC	20	1,612	1,776	19	1,779	1,781	96 %
Poly(A) + Rho	13	0,379	0,235	12	0,405	0,225	92 %
Poly(A)	16	0,047	0,043	2	0,118	0,073	13 %
H ₂ O	11	0,028	0,068	0	-	-	0 %

4.2.3 Charakterisierung der Lichtsensitivität von Opsinen im *Xenopus-laevis*-Modell

Zur Evaluierung der Lichtsensitivität der einzelnen Opsine wurden Experimente mit Oozyten, die mit einem Opsin zuzüglich Gustducin und PLC injiziert wurden, durchgeführt. Hierfür kamen Lichtquellen mit den Wellenlängen 254 nm, 312 nm (*filtered lamp for fluorescence* VL-6.MC), 365 \pm 5 nm (LED-UV-Auflicht), 400 nm bis 750 nm (Weißlicht „sichtbares Licht“; Intralux 4000-1), 625 nm bis 750 nm (R95E, 100W, Philips Lighting), 600 nm bis > 2500 nm (mit dem Maximum bei 1100 nm; R95E Infrared rubin, 100W, Philips Lighting) und 880 nm (Infrarot-LED, Conrad Electronics) zum Einsatz. Im Zuge dieser Analysen wurden die Oozyten drei bis vier Tage nach ihrer Injektion auf 0 mV geklemmt und mit 11-*cis*-Retinal-haltigem Puffer umspült. Die Stimulationen mit den verschiedenen Lichtquellen erfolgten jeweils für 1 min und wurde durch 5 min Phasen der Dunkelheit unterbrochen. Pro Oozyte wurden zwischen drei und fünf Stimulationen in variierender Reihenfolge vorgenommen. Dabei wurde streng darauf geachtet, dass die Stimulationen mit Weißlicht für die Oozyten, die mit Rho und Opsin mws injiziert wurden bzw. die Aktivierung mit UV-Licht für Opsin-sws-injizierte Oozyten, die auf Grund ihres Absorptionsmaximums potentiell den stärksten Auswärtsstrom erwarten ließen, jeweils am Ende erfolgten.

Für Rho-injizierte Oozyten wurde neben der Aktivierbarkeit durch sichtbares Licht, die in 93 % der Fälle zu beobachten war, auch eine Aktivierung des Opsins durch UV-Licht gemessen (Abb. 4.11).



Rho + Gust + PLC		254 nm	312 nm	365 nm	Weißlicht	625-750 nm	700 - 1000 nm	880 nm
UV-Licht	254 nm		n.s.	***	***	**	*	*
	312 nm	n.s.		***	***	*	*	*
	365 nm	***	***		*	***	***	***
Weißlicht	400 - 750 nm	***	***	*		***	***	***
	625 - 750 nm	**	*	***	***		n.s.	n.s.
Rotlicht	700 - 1000 nm	*	*	***	***	n.s.		*
	880 nm	*	*	***	***	n.s.	*	

Abb. 4.11. Boxplots von Rhodopsin/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten *Xenopus-laevis*-Oozyten nach Exposition mit Licht variierender Wellenlänge. Dargestellt sind Boxen, die den Bereich vom ersten bis dritten Quartil der maximalen Signalamplitude umfassen, mit einer Linie, die den Median widerspiegelt (2. Quartil). Die Fühler über und unter der Box repräsentieren die maximalen beziehungsweise minimalen gemessenen Werte für die Signalamplitude nach Stimulation der Oozyten mit Licht der jeweiligen Wellenlänge. Die Boxplots zeigen die Stärke der Auswärtsströme aller analysierten Oozyten, d. h. reagierender und nicht-reagierender Oozyten, welche mit dem humanem Rhodopsin (Rho), α -Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC) injiziert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über den Kruskal-Wallis- und den Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur (*, $\alpha \leq 0,05$; **, $\alpha \leq 0,01$; ***, $\alpha \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant).

Tab. 4.7. Anzahl und Angaben zur Lichtreaktion von Rhodopsin/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten *Xenopus*-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen. Die Exposition der Oozyten mit variierenden Lichtquellen erfolgte nach 30 min Inkubation in 11-cis-Retinal-haltigem Puffer. Pro Oozyte wurden drei bis fünf Stimulationen – getrennt von fünfminütigen Dunkelphasen – vorgenommen. MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung

Rho + Gust + PLC		analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
		Oozyten	MW [µA]	STABW [µA]	Oozyten	MW [µA]	STABW [µA]	
UV-Licht	254 nm	8	0,124	0,170	6	0,178	0,175	75 %
	312 nm	7	0,229	0,347	3	0,393	0,397	43 %
	365 nm	19	1,856	1,433	17	2,067	1,364	90 %
Weißlicht	400 - 750 nm	43	3,189	3,238	40	3,438	3,234	93 %
Rotlicht	625 - 750 nm	12	0,019	0,031	0	-	-	0 %
	700 - 1000 nm	15	0,027	0,016	0	-	-	0 %
	880 nm	8	0,017	0,018	0	-	-	0 %

Das UV-Licht der Wellenlänge 365 nm führte in vergleichbarer Häufigkeit zur Induktion eines Auswärtsstromes wie Weißlicht (90 %). Für UV-Licht der Wellenlängen 312 nm und 254 nm wurde ein solcher Auswärtsstrom bei der Zwei-Elektroden-Spannungsklemmmessung in nur 43 % bzw. 75 % der Fälle detektiert. Mit Abnahme der Wellenlänge wurde darüber hinaus im Mittel eine Reduktion der maximalen Signalamplitude beobachtet (Tab. 4.7). Bei Stimulation der Rho-injizierten Oozyten mit Rotlicht kam es bei keiner der verwendeten Lichtquellen zu einer Aktivierung von Rho.

Das Opsin mws hingegen wurde durch alle drei Lichtklassen aktiviert. Die Stimulation von Opsin mws-, Gustducin- und PLC-koinjizierten Oozyten führte in 97 % der Fälle zur Veränderungen des Membranpotentials bei Stimulation mit Weißlicht. Eine Aktivierung der Oozyten nach der Exposition mit UV-Licht konnte in 75 % bis 94 % der analysierten Oozyten beobachtet werden. Ebenso führte die Stimulation mit Rotlicht der Wellenlänge 625 nm bis 750 nm in 75 % der Fälle zu auswärtsgerichteten Ionenströmen. Im Mittel wies die maximale Signalamplitude der Oozyten nur geringe Abweichungen auf (Tab. 4.8). Lediglich die Stimulation mit Rotlicht der Wellenlänge 700 nm bis 1000 nm bedingte bei nur jeder zweiten analysierten Oozyte eine Aktivierung, einhergehend mit einer deutlich geringeren Signalamplitude. Die Exposition der Opsin-mws-Oozyten mit Licht der spezifischen Wellenlänge von 880 nm mündete in keiner detektierbaren Änderung des Membranpotentials (Abb. 4.12).

Tab. 4.8. Anzahl und Angaben zur Reaktion von Opsin-mws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen. Für die elektrophysiologischen Messungen mittels Zwei-Elektroden-Spannungsklemme wurde das Haltepotential auf 0 mV fixiert und die Oozyten mit 11-cis-Retinal-haltigem Puffer umspült. Pro Oozyte erfolgten drei bis fünf Expositionen mit variierenden Lichtquellen – getrennt von fünfminütigen Dunkelphasen. MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; mws, medium wavelength sensitive

mws + Gust + PLC		analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
		Oozyten	MW [µA]	STABW [µA]	Oozyten	MW [µA]	STABW [µA]	
UV-Licht	254 nm	4	1,898	2,170	3	2,523	2,171	75 %
	312 nm	9	0,523	0,514	7	0,671	0,486	78 %
	365 nm	18	1,451	1,484	17	1,532	1,487	94 %
Weißlicht	400 - 750 nm	32	1,547	1,238	31	1,552	1,222	97 %
Rotlicht	625 - 750 nm	8	1,038	1,275	6	1,358	1,334	75 %
	700 - 1000 nm	19	0,171	0,261	9	0,330	0,321	47 %
	880 nm	8	0,024	0,015	0	-	-	0 %

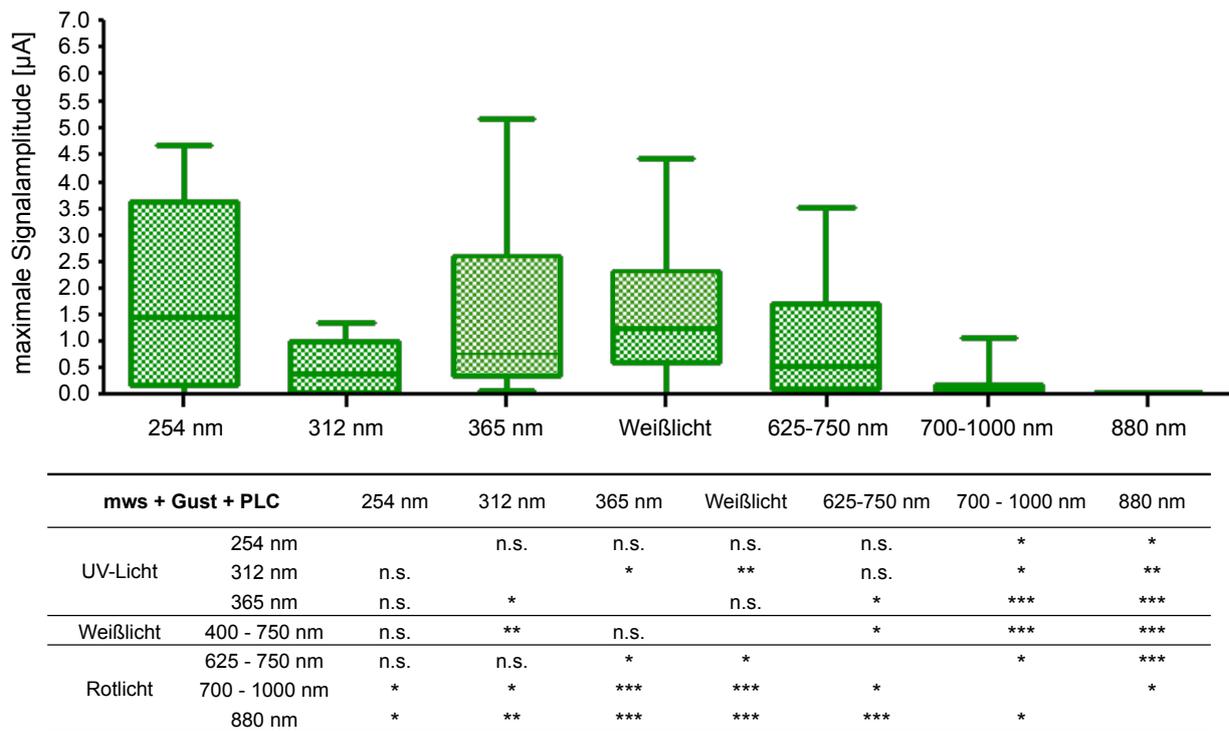
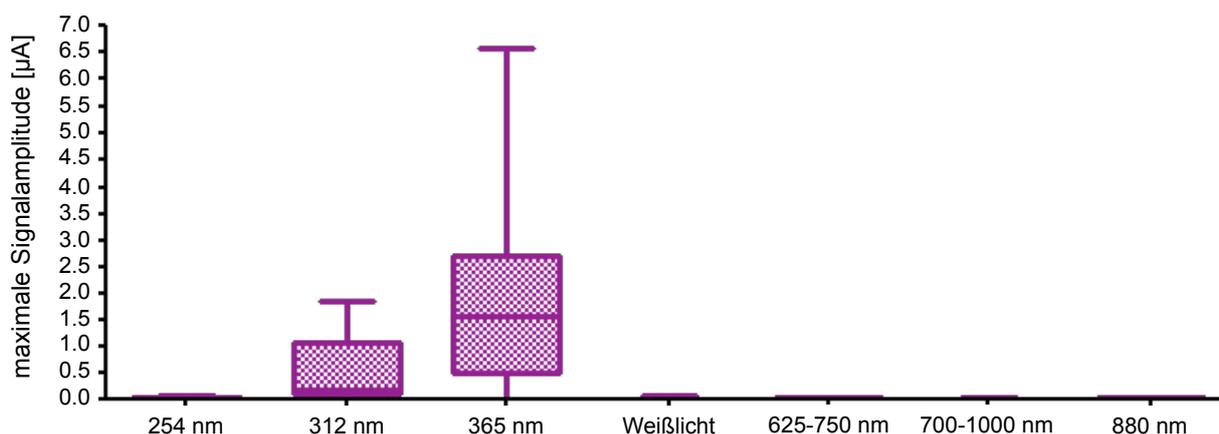


Abb. 4.12. Boxplots von Opsin-mws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten *Xenopus-laevis*-Oozyten nach Exposition mit Licht variierender Wellenlänge. Die dargestellten Boxen umfassen den Bereich vom ersten bis dritten Quartil der maximalen Signalamplitude. Die Linie in der Box gibt den Median wieder (2. Quartil). Die Whisker (Fühler) über und unter der Box repräsentieren die maximalen beziehungsweise minimalen gemessenen Werte für die Signalamplitude nach Stimulation der Oozyten mit Licht der jeweiligen Wellenlänge. Die Boxplots geben den Umfang der Auswärtsströme aller analysierten Oozyten, d. h. reagierender und nicht-reagierender Oozyten, welche mit dem Mausopsin mws (medium wavelength sensitive), α -Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC) injiziert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über den Kruskal-Wallis- und den Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur (*, $\alpha \leq 0,05$; **, $\alpha \leq 0,01$; ***, $\alpha \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant).

Die Opsin-sws-injizierten Oozyten hingegen reagierten ausschließlich auf UV-Licht. In 75 % bis 100 % der untersuchten Oozyten führte die Exposition von Licht der Wellenlängen 254 nm bis 370 nm zur Aktivierung der Signalkaskade (Abb. 4.13; Tab. 4.9). Hierbei zeigten die Oozyten, die mit UV-Licht von 365 ± 5 nm stimuliert wurden, die größte maximale Signalamplitude.

Tab. 4.9. Anzahl und Angaben zur Reaktion von Opsin-sws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen. Die Stimulationen der Oozyten erfolgte nach 30 min Inkubation in 11-cis-Retinal-haltigem Puffer. Pro Oozyte wurden drei bis fünf Expositionen mit variierenden Lichtquellen – getrennt von fünfminütigen Dunkelphasen – vorgenommen. MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung; sws, short wavelength sensitive

sws + Gust + PLC		analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
		Oozyten	MW [μA]	STABW [μA]	Oozyten	MW [μA]	STABW [μA]	
UV-Licht	254 nm	4	0,038	0,022	3	0,047	0,015	75 %
	312 nm	9	0,568	0,648	9	0,568	0,648	100 %
	365 nm	19	2,116	1,921	16	2,509	1,841	84 %
Weißlicht	400 - 750 nm	29	0,012	0,019	0	-	-	0 %
	625 - 750 nm	10	0,010	0,024	0	-	-	0 %
Rotlicht	700 - 1000 nm	13	0,003	0,014	0	-	-	0 %
	880 nm	6	0,010	0,023	0	-	-	0 %



sws + Gust + PLC	254 nm	312 nm	365 nm	Weißlicht	625-750 nm	700 - 1000 nm	880 nm
UV-Licht	254 nm	***	**	**	*	**	*
	312 nm	***		**	***	***	***
	365 nm	**	**		***	***	***
Weißlicht	400 - 750 nm	**	***	***	n.s.	**	n.s.
	625 - 750 nm	*	***	***	n.s.	n.s.	n.s.
Rotlicht	700 - 1000 nm	**	***	***	**	n.s.	n.s.
	880 nm	*	***	***	n.s.	n.s.	n.s.

Abb. 4.13. Boxplots von Opsin-sws/Gustducin/Phospholipase-C-injizierten Xenopus-laevis-Oozyten nach Exposition mit Licht variierender Wellenlänge. Die Box umfasst den Bereich des ersten bis dritten Quartils der maximalen Signalamplitude. Die Linie in der Box spiegelt den Median wider (2. Quartil). Die Whisker (Fühler) über und unter der Box repräsentieren die maximalen beziehungsweise minimalen gemessenen Werte für die Signalamplitude nach Stimulation der Oozyten mit Licht der jeweiligen Wellenlänge. Die Boxplots zeigen die Amplitude der Auswärtsströme aller analysierten Oozyten, d. h. reagierender und nicht-reagierender, welche mit dem Mausopsin short wavelength sensitive (sws), α -Gustducin (Gust) und Phospholipase C β 2 (PLC) injiziert wurden. Die statistische Auswertung erfolgte über den Kruskal-Wallis- und den Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur (*, $\alpha \leq 0,05$; **, $\alpha \leq 0,01$; ***, $\alpha \leq 0,001$; n.s., nicht signifikant).

Wasser-injizierte Oozyten zeigten bei keinem der verwendeten Lichtstimuli eine Änderung des Membranpotentials (Tab. 4.10).

Tab. 4.10. Anzahl und Angaben zur Reaktion von Wasser-injizierten *Xenopus*-Oozyten auf Lichtstimuli verschiedener Wellenlängen. Die Stimulation der Oozyten erfolgte parallel zu den oben angefügten Opsin-injizierten Oozyten. Diese wurden 30 min in 11-cis-Retinal-haltigem Puffer bei einer Klemmspannung von 0 mV in der Messkammer inkubiert. Pro Oozyte wurden drei bis fünf Belichtungen mit variierenden Quellen – getrennt von fünfminütigen Dunkelphasen – vorgenommen. H₂O, Wasser; MW, Mittelwert; STABW, Standardabweichung

	H ₂ O	analysierte Oozyten			signalgebende Oozyten			Anteil signalgebender Oozyten an analysierten Oozyten
		Oozyten	MW [μA]	STABW [μA]	Oozyten	MW [μA]	STABW [μA]	
UV-Licht	254 nm	4	0,015	0,010	0	-	-	0 %
	312 nm	10	0,011	0,003	0	-	-	0 %
	365 nm	20	0,023	0,024	0	-	-	0 %
Weißlicht	400 - 750 nm	37	0,024	0,031	0	-	-	0 %
	625 - 750 nm	16	0,026	0,030	0	-	-	0 %
Rotlicht	700 - 1000 nm	11	0,012	0,006	0	-	-	0 %
	880 nm	8	0,015	0,011	0	-	-	0 %

Hieraus wird ersichtlich, dass mit Ausnahme von Opsin sws, die mittelwelligen Photorezeptoren Rho und Opsin mws ein breites Anregungsspektrum aufweisen. Während für die UV-Pigmente bereits beschrieben ist, dass sie nur durch ein sehr engen Wellenlängenbereich um 360 nm aktiviert werden (Yokoyama, 2000), war das breite Anregungsspektrum für Rho und Opsin mws überraschend.

4.3 Generierung von Mausmodellen mit modifiziertem Geschmacksrezeptorlocus

Für die Analyse gustatorischer Kommunikationsbahnen sollten Mausmodelle generiert werden, deren Geschmackssystem durch einen biophysikalischen Stimulus, die Applikation von Licht, induziert werden kann.

Zu diesem Zweck wurde bei diesen Mausmodellen der Locus eines Geschmacksrezeptors, der an der Vermittlung der Geschmacksmodalität umami, süß oder bitter beteiligt war, durch die Integration von lichtsensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ersetzt. Die Generierung der *Knockout-/Knockin*-Mäuse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Ulrich Boehm am Institut für neurale Signaltransduktion des Zentrums für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) und der transgenen Tiereinheit des ZMNHs.

4.3.1 Mausmodell *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*

Für die Modifikation des *Tas1r1*-Locus, dessen Genprodukt an der Vermittlung des Umami-Geschmacks beteiligt ist, wurde ein *Targeting*-Vektor zur Manipulation von ES-Zellen generiert. Parallel hierzu wurde eine Strategie erstellt, auf deren Grundlage rekombinante ES-Zellklone nach Einbringung des *Targeting*-Vektors analysiert und homolog rekombinierte ES-Zellklone identifiziert werden sollten.

4.3.1.1 *Targeting*-Strategie für *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*

Das Gen der Umami-Rezeptoruntereinheit *Tas1r1* (Geschmacksrezeptor Typ 1, Mitglied 1; *GenBank number*: AF301161; Bachmanov *et al.*, 2001), ist auf dem Chromosom vier der Maus lokalisiert. Die kodierende Sequenz des Rezeptors erstreckt sich von Basenpaar 150.871.714 bis 150.882.368 (10.655 bp) auf dem Minus-Strang des Chromosoms. Sein Transkript von 2892 bp umfasst sechs Exons. Für den gezielten Austausch der *Tas1r1*-kodierenden Region beinhaltete der *Targeting*-Vektor homologe Sequenzen, die sich an das 5'- und 3'-Ende der kodierenden Sequenz des 129/Sv-Mausstammes anschließen. Diese 5'- und 3'-Fragmente umfassten 3,8 kb bzw. 2,3 kb und sollten die Anlagerung an das Erbmaterial als Grundvoraussetzung für die homologe Rekombination ermöglichen. Zwischen jenen flankierenden Fragmenten enthielt der *Targeting*-Vektor eine *Knockin*-Kassette, bestehend aus humanem Rho (*GenBank number*: U49742; Yokoyama, 2000), einer internen ribosomalen Eintrittsstelle (IRES, *internal ribosomal entry site*), humanisiertem *Renilla* grün fluoreszierenden Protein (hrGFP, *humanized renilla green fluorescent protein*) und einer Selektionskassette mit Hoden-spezifischen Angiotensin-umsetzendem Enzym (ACN; *testis specific Angiotensin converting enzyme/Cre-Rekombinase/Neomycin*). Letztere wurde durch zwei *LoxP*-Erkennungsstellen flankiert und sollte beim Durchlaufen der Spermatogenese durch das Wirken der Testis-spezifischen Cre-Rekombinase (tACE) eliminiert werden. Das resultierende Allel exprimiert die *Knockin*-Kassette und eine *LoxP*-Erkennungsstelle unter der Kontrolle des *Tas1r1*-Promotors.

Basierend auf einem Restriktionsverdau der ES-Zell-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und dem Einsatz einer Sonde (Sonde I) sollten ES-Zellklone, in denen eine homologe Rekombination zum Austausch der *Tas1r1*-kodierenden Region durch das *Targeting*-Konstrukt geführt hat, im *Southern Blot* identifiziert werden (Abb. 4.14). Die hier erwarteten radioaktiv markierten Fragmente sollten eine Größe von 13,4 kb (für das Wildtyp-Allel) und 7,7 kb (für das modifizierte Allel) aufweisen.

Durch die Verwendung der Sonde I bei einem Restriktionsverdau mit *BamHI* sollte ferner die erfolgreiche Eliminierung der ACN-Kassette während der Spermatogenese bewiesen werden. Der Verdau mit *BamHI* sollte zur Markierung von Fragmenten mit einer Größe von 11,6 kb (für das Wildtyp-Allel) und 9,3 kb (für das modifizierte Allel neo⁺) bzw. 8,3 kb (für das modifizierte Allel neo⁻) führen. Mittels einer zweiten Sonde (Sonde II), die gegen die Rho-Sequenz gerichtet war, sollte die einmalige Integration des *Targeting*-Konstruktes aufgezeigt werden. Hierfür sollte die ES-Zell-DNA mit dem Restriktionsenzym *BamHI* behandelt werden. Das erwartete Fragment umfasste eine Größe von 8,3 kb (für das modifizierte Allel neo⁻).

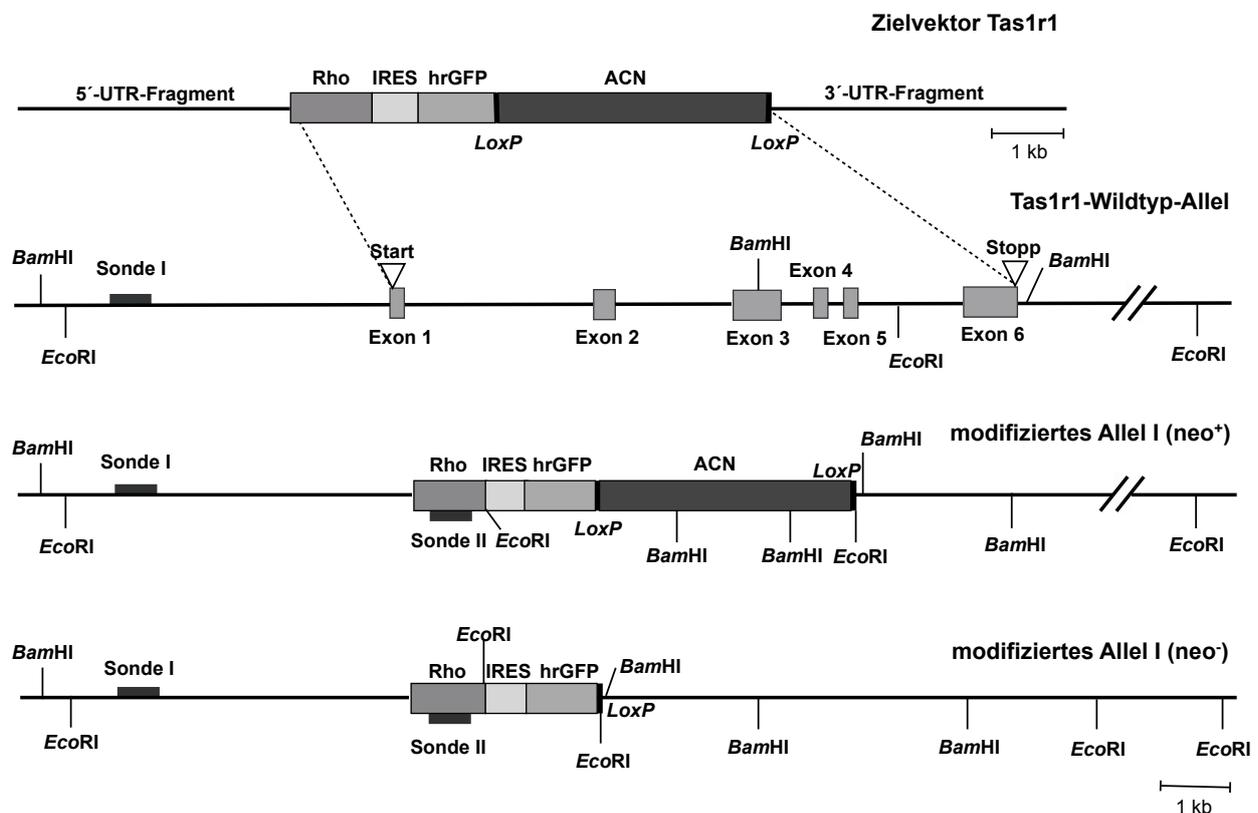


Abb. 4.14. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von Rho, IRES und hrGFP unter Kontrolle des *Tas1r1*-Promotors. Die Integration des Targeting-Konstruktes in kodierende Region des *Tas1r1*-Rezeptors führte zur Generierung eines modifizierten *Tas1r1*-Allels (neo⁺). Dieses exprimiert unter Kontrolle des *Tas1r1*-Promotors den lichtsensitiven Rezeptor Rhodopsin (*Rho*), ein IRES-Element (internal ribosomal entry site), das stationäre Markerprotein hrGFP (humanized renilla green fluorescent protein) und die ACN-Kassette. Nach erfolgreicher Entfernung der ACN-Kassette (nach Durchlaufen der Spermatogenese) kodierte das resultierende mutierte Allel (neo⁻) für *Rho*, *IRES*, *hrGFP* sowie eine *LoxP*-Erkennungsstelle. Die Modifikation sollte nach Wirken der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI* und der Nutzung der radioaktiv markierten Sonden I und II mittels *Southern Blot* veranschaulicht werden. Die Lage jener Sonden kann der schematischen Darstellung entnommen werden. UTR, untranslatierter Sequenzbereich

4.3.1.2. Generierung des *Targeting*-Konstruktes *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*

Für die Generierung von Mäusen, die im *Tas1r1*-Locus den lichtsensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptor Rho exprimieren, wurde auf einen zuvor erfolgreich angewandten *Targeting*-Vektor für den *Tas1r1*-Locus von Dr. Anja Voigt mit der Bezeichnung „*Tas1r1^{BL-IRES-mCherry}*“ (Dissertation Dr. Anja Voigt, Berlin, 2011) zurückgegriffen. Dieses *Targeting*-Konstrukt umfasste neben dem homologen 3,8 kb umfassenden 5´- und dem 2,3 kb großen 3´-Fragment des *Tas1r1*-Rezeptors eine *Knockin*-Kassette, bestehend aus einer kurzen Intronsequenz, dem transsynaptischen Markerprotein Gerstenlektin (*Barley Lectin*, BL), IRES und dem stationären Fluoreszenzprotein mCherry, nebst der Selektionskassette ACN (Abb. 4.15). Für die Expression von Rho unter Kontrolle des *Tas1r1*-Promotors wurde die *Knockin*-Kassette des *Tas1r1^{BL-IRES-mCherry}*-Zielvektors im pKO Scrambler V901-DTA durch Rho ersetzt. Hierfür wurde die cDNA-kodierende Sequenz des Rho mittels *PfuTurbo*-Polymerase von cDNA des humanen Auges amplifiziert, über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und in den pCR-2.1-TOPO-Vektor kloniert. Nach Amplifikation des pCR-2.1-TOPO-Rho-Vektors in TOP10-Zellen und Präparation des Plasmids wurde dieses mit den Restriktionsenzymen *AatII* und *XhoI* verdaut und das Rho-umfassende Fragment mittels Gelelektrophorese isoliert. Der *Tas1r1^{BL-IRES-mCherry}*-Zielvektor wurde über dieselben Schnittstellen *AatII* und *XhoI* geöffnet, das Intron-BL-IRES-mCherry-umfassende Fragment vom 3´-5´-ACN-pKO-Scrambler-Fragment durch Agarosegelelektrophorese separiert und isoliert. Nach Dephosphorylierung des Vektors unter Nutzung der alkalischen Phosphatase (SAP) und Dialyse erfolgte die Ligation des Rho-Fragmentes und des dephosphorylierten, modifizierten pKO-Scrambler-V901-DTA-Vektors. Folglich enthielt der *Targeting*-Vektor neben den homologen 3´- und 5´-Fragmenten Rho und die Selektionskassette ACN, flankiert von zwei *LoxP*-Erkennungsstellen. Die Linearisierung des Konstruktes erfolgt über die 5´ gelegene *Ascl*-Schnittstelle.

Auf Grund einer wenig erfolgreichen, basengenauen Integration des *Targeting*-Vektors in die kodierende Region des *Tas1r1*-Rezeptors wurde das oben beschriebene Konstrukt durch die Einführung des stationären Fluoreszenzproteins hrGFP erweitert. Hierfür wurde der *Tas1r1^{Rho}*-*Targeting*-Vektor mit *XhoI* linearisiert, nach Agarosegelelektrophorese isoliert und anschließend dephosphoryliert. Zur Integration zweier singulärer Schnittstellen zwischen Rho und der Selektionskassette ACN wurde über die *XhoI*-Schnittstelle ein Verbindungsstück, bestehend aus *XhoI*-*PacI*-*PmeI*-*XhoI* eingefügt. Zu diesem Zweck wurden zwei 5´-phosphorylierte Oligonukleotide, die jene Schnittstellen enthielten, hybridisiert und mit dem linearisierten *Tas1r1^{Rho}*-*Targeting*-Vektor ligiert. Anschließend wurden die Plasmide sequenziert, um die Orientierung des integrierten Verbindungsstückes zu bestimmen. Nach Identifizierung eines geeigneten Plasmids wurde dieses mit *PacI* und *PmeI* verdaut, der Vektor aufgereinigt und dephosphoryliert. Das zu integrierende DNA-Sequenz des Fluoreszenzproteins hrGFP, welchem eine IRES-Sequenz voranging, wurde aus dem *Targeting*-Konstrukt *Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}* von Dr. Anja Voigt (Dissertation Dr. Anja Voigt, Berlin, 2011) gewonnen. Hierfür wurde das *Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP}*-Konstrukt mit *PmeI* inkubiert und die entstandenen Fragmente (8760 bp und 4044 bp) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Isolation des gewünschten Restriktionsabschnittes (4044 bp) wurde dieser mit *PacI* verdaut. Die entstandenen Fragmente (1623 bp und 2421 bp) wurden abermals elektrophoretisch separiert

und das kleinere von ihnen isoliert. Das gewonnene finale Fragment umfasst IRES-hrGFP, flankiert von den Restriktionsschnittstellen *PacI* und *PmeI*. Hieran anknüpfend wurde das IRES-hrGFP-Fragment in den um zwei singuläre Restriktionsschnittstellen erweiterten, dephosphorylierten *Tas1r1^{Rho}-Targeting*-Vektor über Ligation integriert. Die finale Sequenzierung des generierten *Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP-Targeting*-Vektors bestätigte die Korrektheit der Sequenzabschnitte 3'- und 5'-Fragment, Rho, IRES, hrGFP und ACN-Kassette.

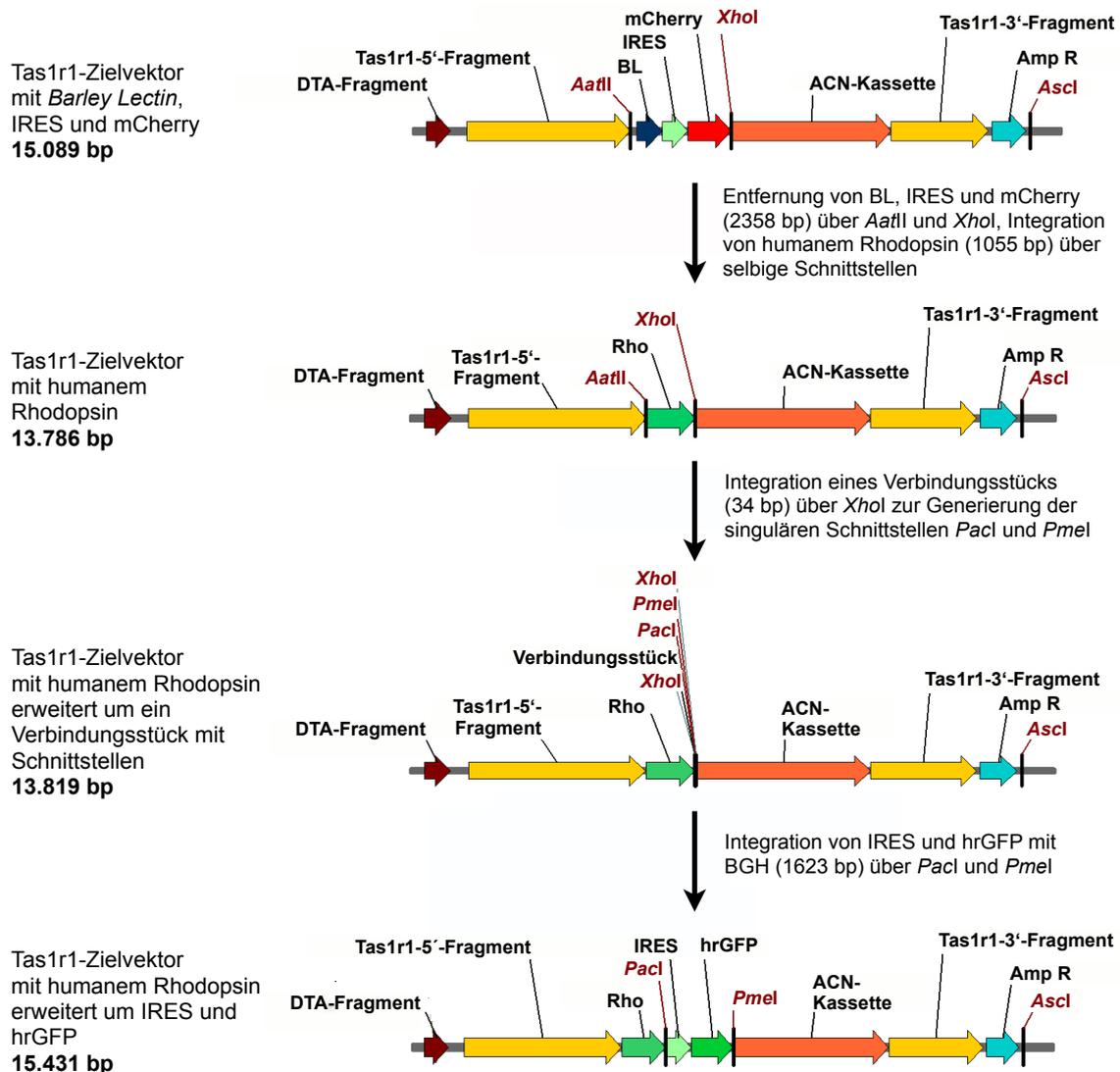


Abb. 4.15. Schematische Darstellung der Generierung des Targeting-Konstruktes für die Mauslinie *Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP*. Basis für den *Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP*-Vektor war der Zielvektor *Tas1r1^{BL}-IRES-mCherry* in pKO Scrambler V901-DTA. Durch einen Restriktionsverdau mit *AatII* und *XhoI* wurde der Intron-BL-IRES-mCherry umfassende Plasmidabschnitt aus dem Zielvektor entfernt und durch Ligation des für das humane Rhodopsin (*Rho*) kodierenden Fragmentes, über dieselben Schnittstellen, ersetzt. Für die Integration eines Verbindungsstückes zur Einbringung zweier singulärer Schnittstellen zwischen den kodierenden Bereichen für *Rho* und der Selektionskassette ACN wurde der *Tas1r1^{Rho}*-Vektor mit *XhoI* linearisiert und das *XhoI*-flankierte Bindungsstück integriert. Anschließend wurde das Plasmidfragment, welches die Sequenz von IRES und hrGFP umfasst und die ihrerseits von den Restriktionsschnittstellen *PacI* und *PmeI* flankiert waren, in den Zielvektor eingesetzt. Hierfür wurde das IRES-hrGFP-Fragment aus dem Targeting-Vektor *Tas2r131^{BL}-IRES-hrGFP* isoliert und über die Schnittstellen *PacI* und *PmeI* in den Zielvektor *Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP* integriert. Für die Linearisierung des Targeting-Vektors wurde die 3'-gelegene *Ascl*-Schnittstelle verwendet. BL, Barley Lectin, hrGFP, humanized renilla green fluorescent protein, IRES, internal ribosomal entry site

4.3.2 Mausmodell *Tas1r2^{Opsin mws}*

Für die Manipulation des *Tas1r2*-Locus, dessen Protein zusammen mit dem dritten Mitglied der Typ-1-Geschmacksrezeptorfamilie (*Tas1r3*) einen funktionellen Süßrezeptor bildet, wurde ein *Targeting*-Vektor sowie eine Strategie zur Modifikation des *Tas1r2*-Locus erstellt. Diese bildeten den Ausgangspunkt für die Generierung und Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone.

4.3.2.1 *Targeting*-Strategie für *Tas1r2^{Opsin mws}*

Das Gen des Geschmacksrezeptors Typ 1, Mitglied 2 (*Tas1r2*; *GenBank number*: NM_031873, AF33041; Li *et al.*, 2009) befindet sich am distalen Ende des vierten Chromosoms der Maus. Der Locus umfasst 16.743 bp (139.209.453-139.226.195 bp), die sich in sechs kodierende Abschnitte und intronische Sequenzen untergliedern lassen. Das aus 853 Aminosäuren bestehende Membranprotein sollte unter Einbringung des unten angeführten *Targeting*-Vektors durch das murine Opsin *mws* ersetzt (*GenBank number*: AF011389; Yokoyama, 2000) werden.

Hierfür sollte ein *Targeting*-Vektor mit homologen 5´- und 3´-Fragmenten, die die kodierende Region des *Tas1r2*-Rezeptors flankieren, dem Opsin *mws* und der Selektionskassette (ACN) generiert werden. Die untranslatierten Bereiche 5´ und 3´ der kodierenden Region des *Tas1r2*-Rezeptors umfassten 1,2 kb bzw. 2,0 kb und entsprachen der Sequenz des 129/Sv-Mausstammes. Sie sollten die cDNA-Sequenz des Opsin *mws* und die durch zwei *LoxP*-Erkennungsstellen flankierte Selektionskassette umschließen.

Ein Restriktionsverdau der Stammzell-DNA mit *EcoRI* und die Verwendung der 5´-gelegenen Sonde I sollte zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone herangezogen werden (Abb. 4.16). Die im *Southern Blot* markierten Restriktionsfragmente müssten eine Größe von 6,0 kb für das Wildtyp-Allel und 9,9 kb für das modifizierte Allel aufweisen. Die Entfernung der ACN-Kassette nach Durchlaufen der Spermatogenese sollte durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und der Anwendung der Sonde II, die den Sequenzbereich des Opsin *sws* detektierte, visualisiert werden (Abb. 4.16). Die Hybridisierung mit Sonde II sollte zur Markierung von Fragmenten mit einer Größe von 4,6 kb (für das Wildtyp-Allel auf Chromosom X) und 9,9 kb (für das modifizierte Allel *neo*⁺) bzw. 6,2 kb (für das modifizierte Allel *neo*⁻) führen. Weiterhin sollte mit Hilfe der Sonde die singuläre Integration des *Targeting*-Vektors in das Genom nachgewiesen werden.

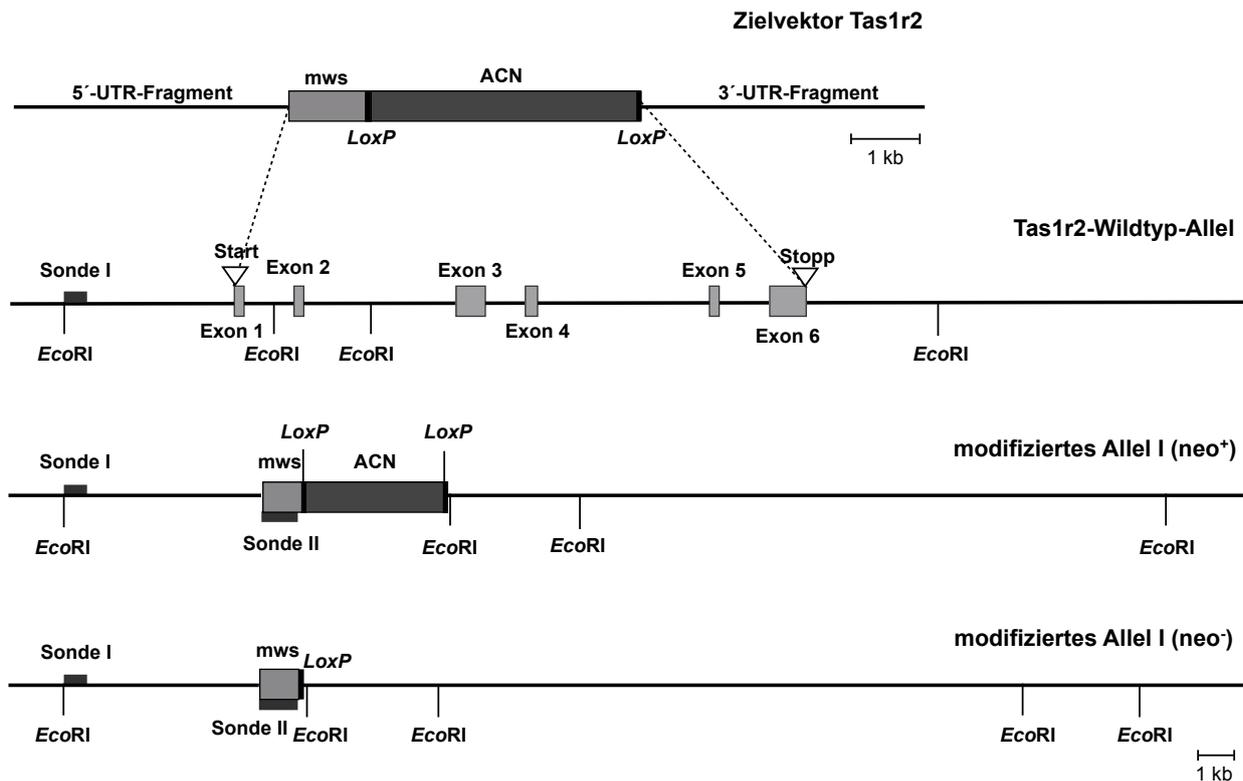


Abb. 4.16. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Expression von Opsin *mws* unter Kontrolle des *Tas1r2*-Promotors. Die Integration des Targeting-Konstruktes in die kodierende Region des *Tas1r2*-Rezeptors führte zur Generierung eines modifizierten *Tas1r2*-Allels (*neo*⁺). Auf Grund dieser Modifikation wurde unter Kontrolle des *Tas1r2*-Promotors der lichtsensitive Rezeptor Opsin *mws* (medium wavelength sensitive) der Maus und die Selektionskassette (ACN) exprimiert. Nach erfolgreicher Entfernung der ACN-Kassette (nach Durchlaufen der Spermatogenese) kodierte das resultierende mutierte Allel (*neo*⁻) für das Opsin *mws* sowie eine LoxP-Erkennungsstelle. Die Manipulation sollte durch einen Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* und der Nutzung der radioaktiv markierten Sonden I und II mittels Southern Blot veranschaulicht werden. Die Lage jener Sonden kann der schematischen Darstellung entnommen werden. UTR, untranslatierter Sequenzbereich

4.3.2.2 Generierung des Targeting-Konstruktes *Tas1r2*^{Opsin *mws*}

Die Generierung der *Tas1r2*^{Opsin *mws*}-Mäuse erfolgte basierend auf einem Targeting-Vektor, welcher sich aus den homologen 5'- und 3'-Bereichen des *Tas1r2*-Rezeptors, dem mittelwelligen Opsin der Maus und einer Selektionskassette zusammensetzte. Für die Generierung dieses Plasmids wurden zunächst die homologen Bereiche und die cDNA-Sequenz des amplifizierten Opsins in den pCR-2.1-TOPO-Vektor subkloniert. Die Generierung der homologen 5'- und 3'-Bereiche erfolgte ausgehend von R1-ES-Zell-DNA des Mausstammes 129/Sv über PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern. Auf diese Weise konnte ein 2015 bp umfassendes 3'-Fragment, flankiert durch die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *Bam*HI, gewonnen werden. Das generierte 5'-Fragment umfasste 1981 bp. Allerdings verursachte eine 74 bp umfassende CT-reiche Region wiederholt Fehler in diesem Sequenzabschnitt. Aus diesem Grunde wurde der 5'-Bereich durch einen Restriktionsverdau mit *ApoI* und *ZraI* von 1981 bp auf 1154 bp stromaufwärts verkürzt. Das entstandene überhängende 5'-Ende des 5'-Armes wurde nachfolgend aufgefüllt und zur Ligation eingesetzt. Die Amplifikation von Opsin *mws* erfolgte mit spezifischen Primern vom pGEMHE5-Opsin-*mws*-

Vektor unter Einbringung einer 5'-flankierenden *Aat*II- und 3'-terminalen *Bgl*II-Schnittstelle. Für die Integration der *Targeting*-Komponenten in den pKO Scrambler wurde ein 45 bp umfassendes Verbindungsstück aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden nach Phosphorylierung und Hybridisierung in den Vektor über *Hpa*I und *Ssp*I eingebracht. Dieser *Linker* enthielt definierte Restriktionsschnittstellen, die die Grundlage für die nachfolgende Klonierung des *Targeting*-Konstruktes bildeten. Diese ist schematisch in Abb. 4.17 dargestellt.

Die Überprüfung der eingeführten Schnittstellen mittels Restriktionsverdau verdeutlichte, dass alle Schnittstellen – mit Ausnahme von *Hpa*I – für die weitere Klonierung genutzt werden konnten. Die Integration des 3'-Fragmentes erfolgte über *Asc*I und *Bam*HI. Hierfür wurde der erweiterte pKO-Scrambler-V901-DTA-Vektor mit diesen Enzymen geöffnet, dephosphoryliert und mit dem 2,0 kb umfassenden 3'-Bereich des Tas1r2-Rezeptors ligiert. Nachfolgend wurde die Sequenz des Opsin mws integriert. Zu diesem Zweck wurde der pCR-2.1-TOPO-Opsin-mws-Vektor mit *Aat*II und *Bgl*II verdaut und die entsprechenden DNA-Fragmente (1965 bp, 1578 bp und 1088 bp) auf einem Agarosegel elektrophoretisch separiert. Das Opsin-enthaltende 1088 bp-Fragment wurde anschließend aus dem Agarosegel isoliert und in den geöffneten, dephosphorylierten pKO-Tas1r2-3'-Fragment-Vektor ligiert. Hieran schloss sich die Einbringung der ACN-Kassette an. Die Selektionskassette ACN wurde durch Restriktionsverdau des Plasmids pACN mit *Bgl*II gewonnen und in den mit *Bgl*II geöffneten, dephosphorylierten Vektor integriert. Im letzten Schritt der Generierung des Tas1r2-*Targeting*-Vektors erfolgt die Integration des 5'-Bereiches des Tas1r2-Rezeptors. Hierfür wurde der pCR-2.1-TOPO-Tas1r2-5'-Fragment-Vektor mit *Apo*I (*Xap*I) verdaut. Die entstandenen Fragmente (3500 bp, 1164 bp und 841 bp) wurden elektrophoretisch aufgetrennt und das 1164 bp umfassende Fragment isoliert. Nach Auffüllung des überhängenden 5'-Endes mittels Klenow-Fragment wurde das Plasmidfragment mit *Zra*I inkubiert. Nach Aufreinigung des Plasmidstückes wurde dieses mit Hilfe der T4-Ligase bei 4°C über Nacht mit dem dephosphorylierten und mit *Zra*I geöffneten pKO-Scrambler-Konstrukt ligiert. Die Orientierung der Integration des Tas1r2-5'-Bereiches wurde anschließend durch einen Restriktionsverdau überprüft und ein geeignetes Plasmid einer Sequenzierung unterzogen. Nach Bestätigung der korrekten Sequenz des *Targeting*-Vektors wurde dieser mit *Pme*I linearisiert und für die Manipulation von Stammzellen eingesetzt.

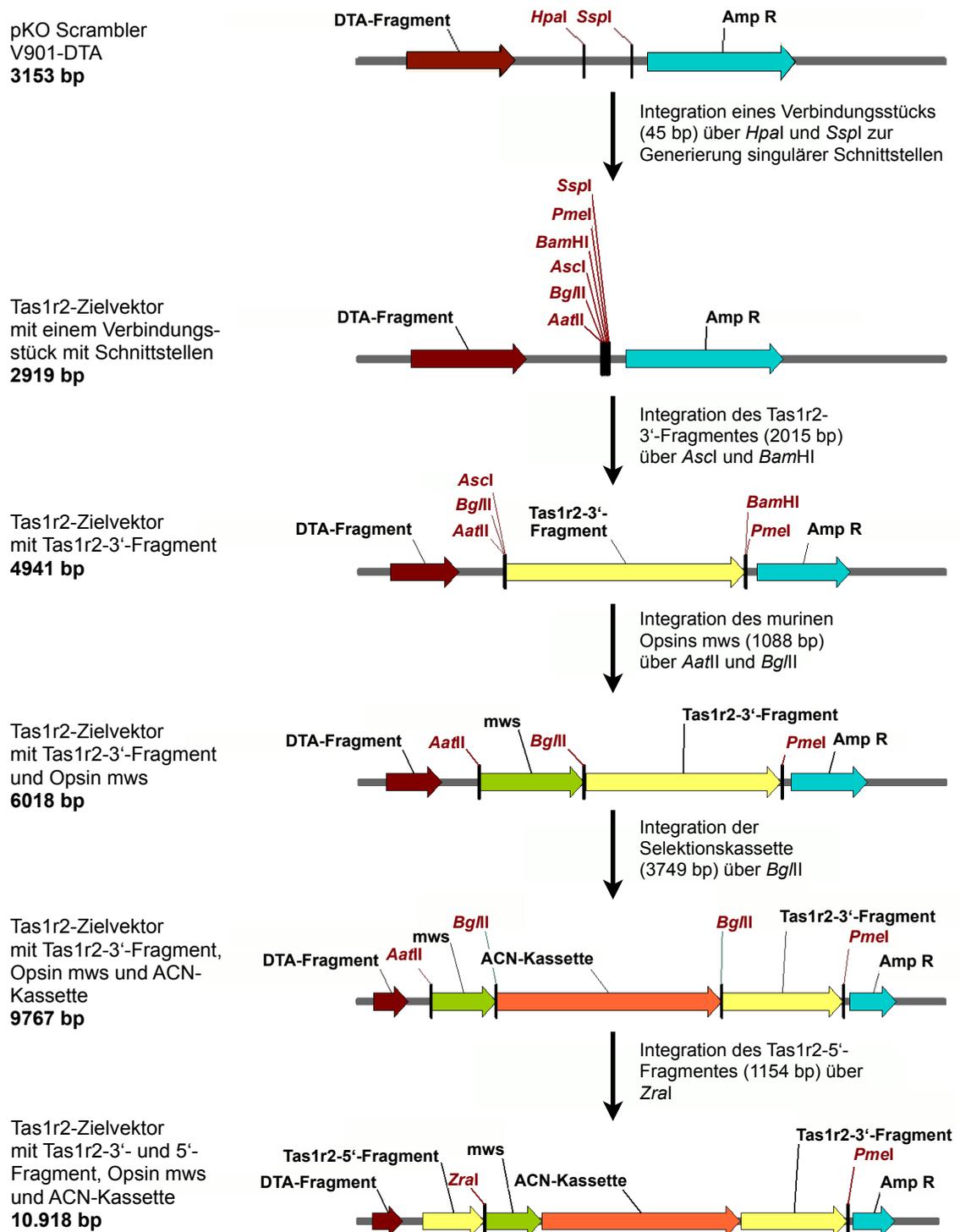


Abb. 4.17. Schematische Darstellung der Generierung des Targeting-Konstruktes für die Mauslinie *Tas1r2^{Op sin mws}*. Grundlage für den *Tas1r2^{Op sin mws}*-Zielvektor war der Vektor pKO Scrambler V901-DTA, in den mittels eines Restriktionsverdau mit *HpaI* und *SspI* ein Verbindungsstück mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen eingebracht wurde. Dieser modifizierte Vektor wurde durch die Enzyme *AscI* und *BamHI* erneut geöffnet und um das 3'-Fragment (untranslatierter Bereich) des *Tas1r2*-Rezeptors erweitert. Anschließend erfolgte die Integration der für das Opsin mws (medium wavelength sensitive) kodierenden Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *AatII* und *BglII*. Für die Einbringung der Selektionskassette ACN wurde der pKO-Scrambler-Vektor mit *BglII* linearisiert und die *BglII*-flankierte Selektionskassette integriert. Abschließend wurde das Plasmidfragment, welches die homologe Sequenz des 5'-Fragmentes des *Tas1r2*-Rezeptors beinhaltet, in den Zielvektor eingesetzt. Hierfür wurde der Targeting-Vektor über das *AatII*-Isoschizomer *ZraI* geöffnet und mit dem 5'-Fragment ligiert. Für die Linearisierung des Targeting-Vektors wurde die 3'-gelegene *PmeI*-Schnittstelle verwendet.

4.3.3 Mausmodell *Tas2r114*^{Opsin sws}

Für die Erzeugung einer *Knockout/Knockin*-Maus, die ein kurzweilig anregbares Opsin im Bitterrezeptorlocus *Tas2r114* exprimiert, wurde ein *Targeting*-Vektor sowie eine Strategie zur Modifikation des *Tas2r114*-Locus erstellt. Hierauf basierend erfolgte die Generierung und Identifizierung rekombinanter ES-Zellklone.

4.3.3.1 *Targeting*-Strategie für *Tas2r114*^{Opsin sws}

Das Bitterrezeptorgen *Tas2r114* liegt am Ende eines kleineren *Clusters* aus sechs Bitterrezeptoren auf dem distalen Abschnitt des Chromosoms sechs (131.639.152-131.640.081 bp). Die kodierende Sequenz umfasst ein Exon von 930 bp (*GenBank number*: AY161901; Shi *et al.*, 2003), welches auf dem Minus-Strang des Chromosoms lokalisiert ist. Die Einbringung des *Targeting*-Konstruktes, bedingt durch die Rekombination in den homologen 5'- und 3'-Bereichen des *Tas2r114*-Locus, sollte zum basengenauen Ersatz des Bitterrezeptors *Tas2r114* durch das Opsin *sws* (*GenBank number*: U49720; Yokoyama, 2000) führen. Die untranslatierten 5'- und 3'-Bereiche umfassten hier 2,4 kb bzw. 2,0 kb und entsprachen der Sequenz des 129/Sv-Mausstammes. Neben den homologen Armen und dem Opsin *sws* enthielt der *Targeting*-Vektor die Selektionskassette ACN, die von zwei *LoxP*-Erkennungsstellen flankiert war und der Positivselektion in der ES-Zellkultur diente.

Zur Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone sollte die Stammzell-DNA mit *Apal* verdaut und im *Southern Blot* mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert werden. Die zu detektierenden Restriktionsfragmente sollten eine Größe von 7,8 kb für das Wildtyp-Allel und 4,1 kb für das modifizierte Allel aufweisen. Die ACN-Kassette sollte in Nachkommen von chimären Männchen und C57BL/6-Weibchen entfernt worden sein. Dies könnte durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* und anschließender Hybridisierung mit Sonde I sichtbar gemacht werden. Das modifizierte Allel (neo⁺) sollte eine Fragmentgröße von 8,6 kb aufweisen, während die Entfernung der ACN-Kassette die Detektion eines 4,9 kb-Fragmentes zur Folge hätte. Das Wildtyp-Allel würde durch eine radioaktive Markierung eines 9,7 kb umfassenden Fragmentes visualisiert werden. Die Hybridisierung von genomischer DNA mit der Sonde II, die den Sequenzbereich des Opsin *sws* detektiert, würde die Häufigkeit der Integration des *Targeting*-Vektors in das Genom veranschaulichen. Die Sonde II würde in Kombination mit *EcoRI* verdauter genomischer DNA zur Markierung von Fragmenten mit einer Größe von 9,0 kb (für das Wildtyp-Allel, Opsin *sws* mit Intronsequenzen auf Chromosom sechs) und 4,9 kb (für das modifizierte Allel neo⁻, Opsin *sws* als cDNA-Sequenz) führen. Die *Targeting*-Strategie zur Identifizierung von homolog rekombinierten ES-Zellen kann der Abb. 4.18 entnommen werden.

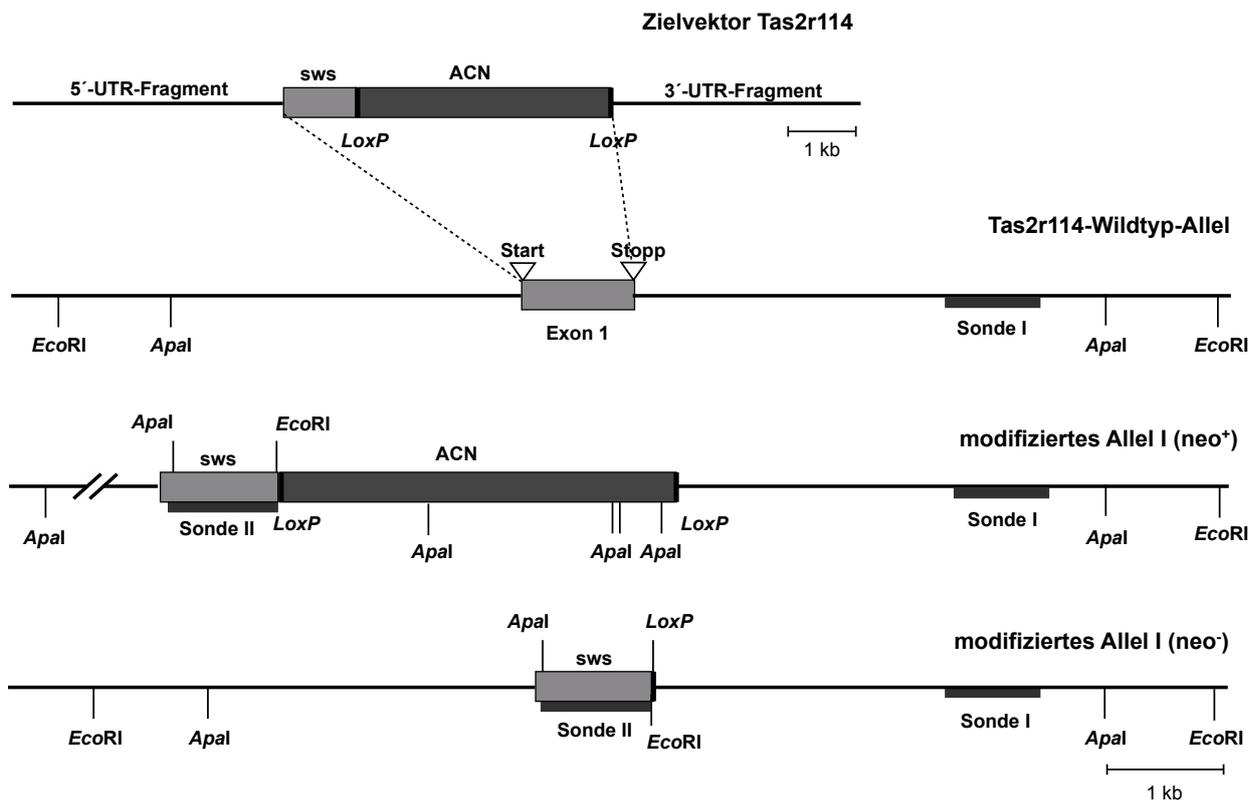


Abb. 4.18. Schematische Darstellung der Targeting-Strategie zur Manipulation der *Tas2r114* kodierenden Region. Die homologe Rekombination der Knockin-Kassette des Targeting-Konstruktes in die kodierende Region des *Tas2r114*-Rezeptors bedingte die Generierung des modifizierten *Tas2r114*-Allels (*neo*⁺). Folglich wurde unter Kontrolle des *Tas2r114*-Promotors das licht-sensitive, kurzweilige Opsin (*sws*) und die Selektionskassette (*ACN*) exprimiert. Nach erfolgreicher Entfernung der *ACN*-Kassette (nach Durchlaufen der Spermatogenese) kodiert das resultierende mutierte Allel (*neo*⁻) für das Opsin *sws* sowie eine *LoxP*-Erkennungsstelle. Das Rekombinationsereignis sollte durch einen Restriktionsverdau mit *Apal* bzw. *EcoRI* und der Nutzung der radioaktiv markierten Sonden I und II mittels Southern Blot aufgezeigt werden. Die Lage jener Sonden kann der schematischen Darstellung entnommen werden. UTR, untranslatierter Sequenzbereich

4.3.3.2 Generierung des Targeting-Konstruktes *Tas2r114*^{Opsin sws}

Für den basengenauen Ersatz des Bitterrezeptors *Tas2r114* durch einen lichtsensitiven G-Protein-gekoppelten Rezeptor wurde ein Targeting-Vektor bestehend aus homologen, untranslatierten 5'- und 3'-Fragmenten, der Selektionskassette *ACN* und dem kurzweiligen murinen Opsin *sws* generiert (Abb. 4.19). Hierfür wurde zunächst ein Verbindungsstück mit zahlreichen Restriktionsschnittstellen aus zwei einzelsträngigen Oligonukleotiden durch Phosphorylierung und Hybridisierung erstellt. Dieser *Linker* wurde nach Entfernung eines 182-bp-Fragmentes über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *AatII* in den pKO Scrambler V901-DTA eingebracht und die in ihm enthaltenden Schnittstellen (*Acc65I*, *AgeI*, *SacII*, *BglII*, *SalI*) durch Restriktionsansätze überprüft. Sie bildeten die Grundlage für die weitere Generierung des Zielvektors. Es folgte die Einbringung des kurzweiligen murinen Opsins. Hierfür wurde die Sequenz des Photorezeptors von cDNA aus Augen einer C57BL/6-Maus amplifiziert. Nach Subklonierung in den pCR-2.1-TOPO-Vektor erfolgte die Integration des Rezeptors in den mit *SacII* und *BglII* geöffneten Targeting-Vektor. Hierfür wurde der pCR-2.1-TOPO-Opsin-*sws*-Vektor mit *SacII* und *BglII* verdaut und das 1000 bp umfassende

Opsin-Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung isoliert und in den geöffneten und dephosphorylierten, erweiterten pKO-Scrambler-Vektor eingebracht. Für die Klonierung der homologen Arme wurden 2,4 kb und 2,0 kb umfassende 5'- bzw. 3'-Fragmente von einem *bacterial artificial chromosome* (BAC, 252C17) des 129/S7-Stammes amplifiziert. Hierfür wurden mittels *Pfu*-Polymerase die definierten Abschnitte vervielfältigt, über Agarosegelelektrophorese separiert und isoliert. Nach Subklonierung der Fragmente in den pCR-2.1-TOPO-Vektor erfolgte die Sequenzierung. Während das 3'-Fragment die basengenaue Sequenz des homologen 3'-Armes des Tas2r114-Rezeptors aufwies, wurde im 5'-Fragment eine Punktmutation detektiert. Für die Entfernung dieser wurde eine Punktmutations-PCR mit Primern, die den inkorrekten Bereich des Fragmentes überspannten, durchgeführt. Anschließend wurde der Restriktionsansatz für 1 h mit *DpnI* verdaut. *DpnI* erkennt seine mit N6-Methyladenineresten versehen Schnittsequenz im inkorrekten *Template*-Konstrukt, die durch die Einbringung der Vektor-DNA in *E.coli*-Bakterien der Nukleinsäure anheften. Dies führte zur spezifischen Fragmentierung des Ausgangskonstruktes und zur Anreicherung des korrigierten Vektors. Dieser wurde nachfolgend in Bakterien eingebracht und die Plasmid-DNA gewonnen. Der korrigierte 5'-Bereich wurde daraufhin über die Restriktionsschnittstelle *Acc65I* und *AgeI* in den geöffneten und dephosphorylierten, Opsin-sws-enthaltenden pKO-Scrambler-Vektor integriert. Anschließend erfolgte die Eingliederung der Selektionskassette. Die Selektionskassette ACN wurde durch Restriktionsverdau des Plasmids pACN mit *BglII* gewonnen und in den *BglII*-geöffneten, dephosphorylierten Vektor integriert. Die Sequenz der ACN-Kassette lag komplementär zum 5'-Fragment und dem Opsin sws vor. Im finalen Schritt erfolgte die Integration des komplementären Tas2r114-3'-Fragmentes in den Zielvektor. Dieses wurde über die Restriktionsschnittstellen *SalI* und *NotI* aus dem pCR-2.1-TOPO-Tas2r114-3'-Fragment-Vektor isoliert und mit dem ebenso geöffneten und dephosphorylierten *Targeting*-Vektor ligiert. Zur späteren Linearisierung des Endkonstruktes wurde die singuläre *AatII*-Schnittstelle herangezogen. Die anschließende Sequenzierung des Zielvektors bestätigte dessen Korrektheit.

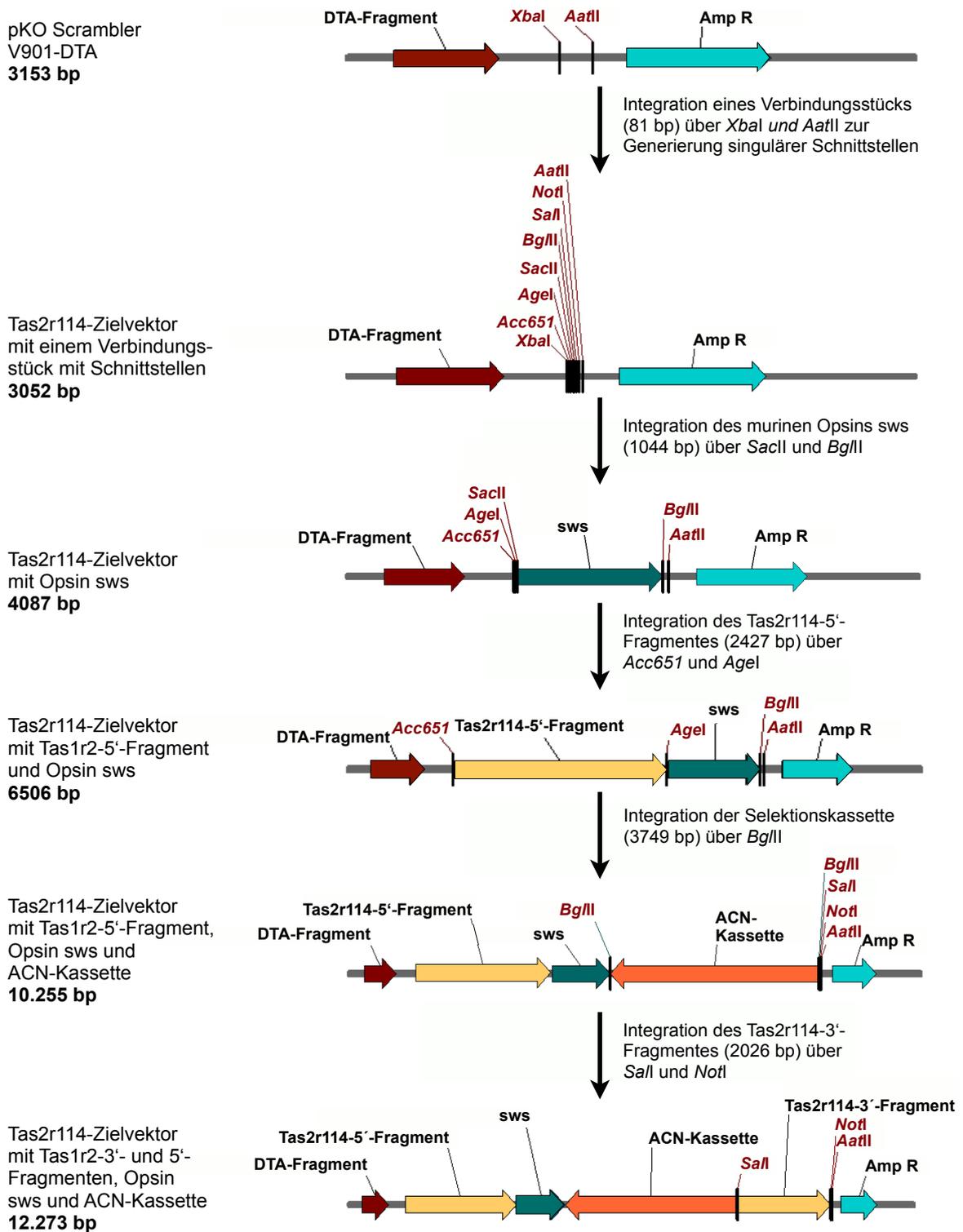


Abb. 4.19. Schematische Darstellung der Generierung des Targeting-Konstruktes für die Mauslinie *Tas2r114^{Opsin sws}*. Das Targeting-Konstrukt *Tas2r114^{Opsin sws}* wurde in dem Vektor pKO Scrambler V901-DTA kloniert, in den mittels eines Restriktionsverdau mit XbaI und AatII ein Verbindungsstück mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen eingebracht wurde. Dieser modifizierte Vektor wurde durch die Enzyme SacII und BglII geöffnet und die cDNA-Sequenz des kurzwelligen Opsins (*sws*) integriert. Anschließend erfolgte die Einbringung des 5'-Fragmentes des *Tas2r114*-Locus über Acc65I und AgeI. Für die Integration der Selektionskassette ACN wurde der pKO-Scrambler-Vektor mit BglII linearisiert und die BglII-flankierte Selektionskassette integriert. Final wurde das Plasmidfragment, welches die homologe Sequenz des 3'-Fragmentes des *Tas2r114*-Rezeptors beinhaltetete, in den Zielvektor eingesetzt. Hierfür wurde der Targeting-Vektor über das SalI und NotI geöffnet und mit dem 3'-Fragment ligiert. Für die Linearisierung des Targeting-Vektors wurde die 3'-gelegene AatII-Schnittstelle herangezogen.

4.3.4 Homologe Rekombination der *Targeting*-Konstrukte in embryonalen Stammzellen

Die zielgerichtete Integration von fremden Genen basiert auf der Geninsertion mittels homologer Rekombination. Hierfür wurden ES-Zellen mit den linearisierten DNA-Konstrukten elektroporiert und 24 h später für eine Woche unter Selektionsdruck mit Geneticin (G418) kultiviert. Die Selektionskassette ACN, die Teil der *Knockin*-Kassette war, führte zu einer Resistenz gegen das Antibiotikum G418 in den Stammzellen, die das Konstrukt aufgenommen und integriert hatten. Resistente ES-Zellklone bildeten adhärenzte Zellklone. Zellklone, die den Vektor an ungewünschten Stellen im Genom integriert hatten, konnten teilweise durch das Produkt der negativen Selektionskassette eliminiert werden (Yagi *et al.*, 1990). Die negative Selektionskassette war ein im pKO-Scrambler-Vektor enthaltendes DTA-Fragment, das für ein Exotoxin des *Corynebacterium diphtheriae* kodierte. Erfolgte die Integration des Vektors mit DTA-Fragment in das Genom produzierten die Klone das Toxin und starben. Durch eine solche Selektion lässt sich eine 2- bis 20-fache Anreicherung der gewünschten Klone bzw. Klone, die Abschnitte des *Knockins*, jedoch nicht das DTA-Fragment, integriert hatten, erreichen (Hasty & Bradley, 1993).

Nach einwöchiger Selektion erfolgte die Vereinzelung resistenter Kolonien. Für das *Targeting*-Konstrukt Tas1r1^{Rho} wurden 384 Klone isoliert und mittels *Southern Blot* analysiert. Von 252 genotypisierten ES-Zellklonen konnte kein Klon mit homologer Rekombination identifiziert werden. Auf Grund des negativen Befundes wurde das *Targeting*-Konstrukt um ein IRES-Element und den Fluoreszenzmarker hrGFP erweitert (siehe Abschnitt 4.3.1.2) und erneut mit murinen Stammzellen elektroporiert. Für das *Targeting*-Konstrukt Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP wurden 264 ES-Zellklone isoliert. Bei beiden *Targeting*-Konstrukten wurde eine Sonde (Sonde I), die im 5'-Bereich außerhalb des *Targeting*-Konstruktes hybridisierte, zur Genotypisierung verwendet (Abb. 4.14). Das Wildtyp-Allel wurde nach einem *EcoRI*-Restriktionsverdau durch eine Fragmentgröße von 13,4 kb und das homolog rekombinierte, mutierte Allel (neo⁺) durch eine Fragmentgröße von 9,8 kb (für das Tas1r1^{Rho}-Allel) bzw. 7,7 kb (für das Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP-Allel) angezeigt. 246 der 264 isolierten ES-Zellklone aus der Elektroporation des Tas1r1^{Rho}-IRES-hrGFP-Konstrukts konnten mittels *Southern Blot* ein eindeutiger Genotyp zugeordnet werden. Unter ihnen waren zwei Klone, die die gewünschte Integration aufwiesen (Abb. 4.20 A).

Die Analyse der ES-Zellklone, die mit dem Tas1r2^{Opsin mws}-*Targeting*-Konstrukt transfiziert wurden, erfolgte ebenfalls mittels einer im 5'-Bereich außerhalb des *Targeting*-Konstruktes bindenden Sonde (Sonde I; Abb. 4.16) nach *EcoRI*-Verdau. Die Hybridisierung der Sonde bedingte im Wildtyp-Allel die Visualisierung eines Restriktionsfragmentes mit einer Größe von 6,0 kb. Bei Auftreten eines Rekombinationsereignisses im Tas1r2-Locus konnte ein Fragment von 9,9 kb detektiert werden. Von 460 isolierten ES-Zell-Kolonien konnte 339 ein Genotyp zugewiesen werden. Hierbei wies eine der analysierten Kolonien die gewünschte Modifikation auf (Abb. 4.20 B).

Für die Manipulation des Tas2r114-Locus wurden 144 Kolonien zur *Southern-Blot*-Analyse nach Elektroporation und Selektion isoliert. Die Identifikation des Genotyps erfolgte mittels einer im 3'-Bereich außerhalb des *Targeting*-Konstruktes gelegenen Sonde (Sonde I; Abb. 4.18). Die

Hybridisierung der Sonde mit dem Restriktionsfragment des Wildtyp-Allels ergab ein 7,8-kb-Fragment. Das homolog rekombinierte, mutierte Allel (neo^+) hatte eine Größe von 4,1 kb. Es konnte in einem von 54 im *Southern Blot* eindeutig detektierbaren Klonen die gewünschte Rekombination nachgewiesen werden (Abb. 4.20 C).

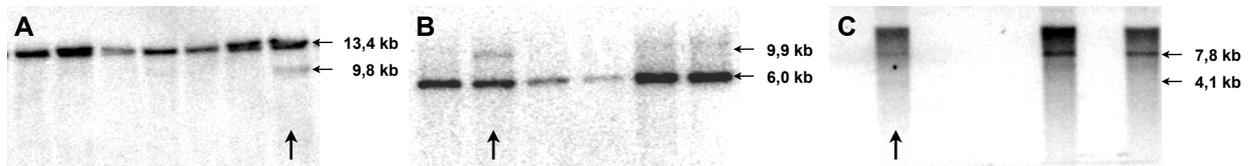


Abb. 4.20. Southern-Blot-Analyse zur Identifizierung von homolog rekombinierten ES-Zellklonen für die Targeting-Konstrukte $Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}$, $Tas1r2^{Opsin\ mws}$ und $Tas2r114^{Opsin\ sws}$. Mit *EcoRI* ($Tas1r1$, $Tas1r2$) bzw. *Apal* ($Tas2r114$) verdaut ES-Zell-DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membranen wurden jeweils mit einer spezifischen 3'- bzw. 5'-gelegenen radioaktiv markierten Sonde (Abb. 4.14, 4.16 bzw. 4.18) hybridisiert. Neben der Wildtyp-Bande von 13,4 kb für $Tas1r1$ (A), 6,0 kb für $Tas1r2$ (B) bzw. 7,8 kb für $Tas2r114$ (C) konnte in seltenen Fällen (Pfeile) zusätzlich eine 9,8 kb (A), 9,9 kb (B) bzw. 4,1 kb (C) umfassende Bande, die für das jeweilige homolog rekombinierte, mutierte Allel charakteristisch war, detektiert werden.

4.3.5 Generierung und Rückkreuzung von Chimären

Nach erfolgreicher Identifizierung homolog rekombinierter ES-Zellklone wurden diese von PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann (ZMNH, Hamburg) in die Blastocysten des C57BL/6-Mausstammes injiziert. Circa 15 solcher manipulierter Blastocysten wurden mittels Transferkapillare in den Uterus von scheinträchtigen C57BL/6xCBA-Weibchen transferiert, welche durch die Verpaarung mit vasktomierten, männlichen Mäusen gewonnen wurden. Scheinträchtige Ammen trugen den Nachwuchs aus und zogen diesen auf. Hierbei konnte bereits an der Fellfarbe zwischen chimären und nicht-chimären Tieren unterschieden werden. Für die Linien $Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}$ und $Tas2r114^{Opsin\ sws}$ lag der Chimärengrad der Nachkommen zwischen 85 % und 100 % (ungefährer prozentualer Anteil der braunen Fellfarbe am Fellkleid; Abb. 4.21). Für die $Tas1r2^{Opsin\ mws}$ -Linie gebaren die Ammen sowohl nicht-chimäre Tiere mit schwarzem Fell als auch Nachwuchs mit einem zwischen 40 % und 100 % variierenden Chimärismus.

Abb. 4.21. Chimäre Nachkommen. Chimäre Männchen aus der Linie $Tas2r114^{Opsin\ sws}$.



Zum Aufbau einer Zucht war es erforderlich, dass die chimären Tiere die Mutation in den Keimbahnzellen trugen, um diese an ihre Nachkommen weitergeben zu können. Zur Überprüfung der Keimbahnfähigkeit wurden Männchen im Alter von acht Wochen, die zwischen 50 % und 100 % chimär waren, mit C57BL/6-Weibchen verpaart. Das Auftreten brauner Nachkommen aus diesen Verpaarungen war der Beweis, dass aus den injizierten ES-Zellen funktionelle Spermien gebildet wurden. Zur Analyse des Genotyps wurde die DNA aus einem Stückchen Schwanzspitze der Tiere isoliert und im *Southern Blot* analysiert. War ein Tier heterozygot für

die Modifikation, so erschien neben der Wildtyp-Bande eine zusätzliche *Knockin*-Bande im Blot (Abb. 4.22, 4.23 und 4.24).

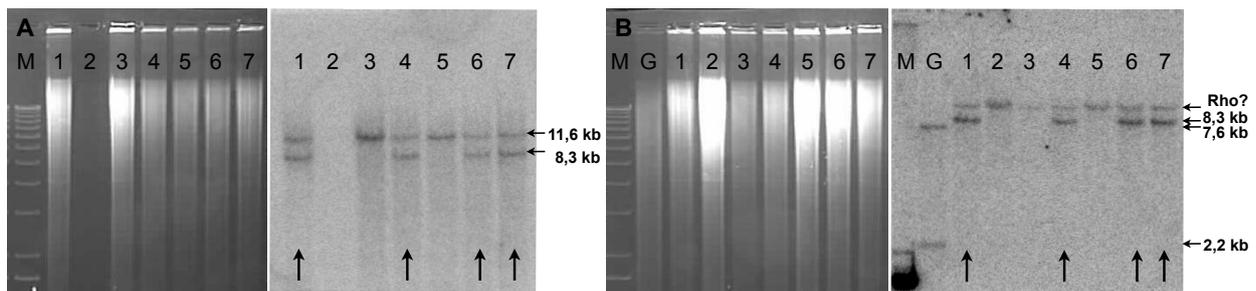


Abb. 4.22. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Nachkommen aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Mäusen. Aus Schwanzbiopsien der *Tas1r1*-Nachkommen wurde DNA isoliert und mit *Bam*HI verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung (A, B links) und Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran wurde diese mit den entsprechenden Sonden I (A) bzw. II (B) hybridisiert. (A) Heterozygote Nachkommen (1, 4, 6, 7) wiesen nach radioaktiver Markierung mit Sonde I neben der Kennzeichnung des Wildtyp-Allels (11,6 kb) eine Markierung des *Knockin*-Allels (8,3 kb) auf. Die *Knockin*-Bande bei 8,3 kb verifiziert weiterhin das Entfernen der ACN-Selektionskassette während der Spermatogenese. (B) Die Hybridisierung mit der gegen humanes Rhodopsin (*Rho*) gerichteten Sonde II führte im heterozygoten Tier zur spezifischen Detektion einer 8,3-kb-Bande (1, 4, 6, 7). Die zweite zu beobachtende Bande, die in heterozygoten und Wildtyp-Nachkommen detektierbar war, ist vermutlich auf die Hybridisierung der Sonde mit dem murinen *Rho* zurückzuführen. M, Marker; G, genomische DNA des Menschen

Abb. 4.22 zeigt die *Southern-Blot*-Analyse von Nachkommen aus der Verpaarung von *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Chimären mit C57BL/6-Weibchen. Vier (1, 4, 6 und 7) der sieben dargestellten Nachkommen waren heterozygot für die Modifikation des *Tas1r1*-Locus.

Die Hybridisierung der genomischen DNA dieser Tiere mit der 5' gelegenen Sonde I nach einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI führte zu zwei Hybridisierungsbanden mit einer Größe von 11,6 kb und 8,3 kb. Erstere markierte das Wildtyp-Allel des *Tas1r1*-Rezeptors, während die kleinere Bande das modifizierte Allel kennzeichnete. Anhand der Größe der *Knockin*-Bande konnte weiterhin die erfolgreiche Eliminierung der ACN-Kassette bei allen heterozygoten Tieren während der Spermatogenese demonstriert werden. Mittels einer zweiten Sonde (Sonde II; Abb. 4.14), die gegen die *Rho*-Sequenz gerichtet war, konnte bei heterozygoten Tieren eine Bande von 8,3 kb detektiert werden. Neben der *Knockin*-Bande konnte bei der Hybridisierung mit Sonde II noch eine weitere Bande, die bei allen analysierten Tieren nachweisbar und vermutlich auf eine Kreuzhybridisierung mit der murinen *Rho*-Sequenz zurückzuführen war, detektiert werden. Dass darüber hinaus keine weitere Hybridisierung mit Sonde II bei den heterozygoten Mäusen verifizierbar war, lässt den Schluss zu, dass bei dem injizierten ES-Zellklon ein einmaliges homologes Rekombinationsereignis aufgetreten war.

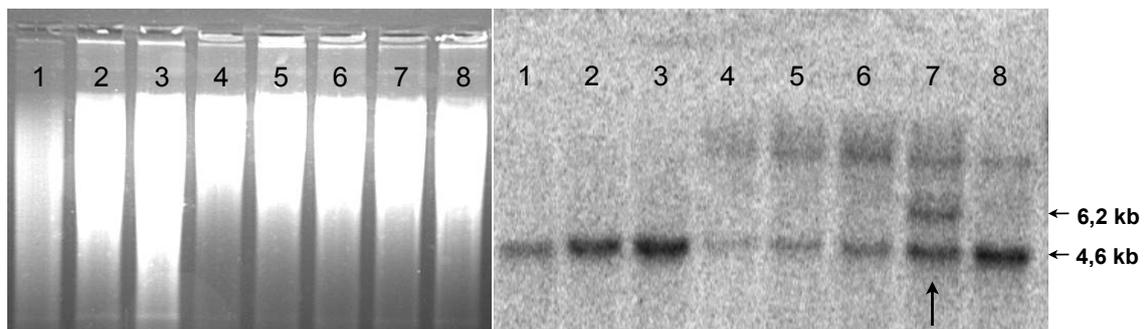


Abb. 4.23. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA von *Tas1r2^{Opsin mws}*-Nachkommen aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Mäusen. Die DNA aus Schwanzbiopsien von *Tas1r2*-Nachkommen wurde nach deren Isolation mit *EcoRI* verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt (links). Nach Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran wurde diese mit der gegen das Opsin gerichteten Sonde II hybridisiert. Heterozygote Nachkommen wiesen neben einer 4,6-kb-Bande, die das Wildtyp-Allel des mittelwelligen Opsins auf dem X-Chromosom aufzeigt, eine Markierung des Knockin-Allels bei 6,2 kb auf (Pfeil). Die Größe der Knockin-Bande bei 6,2 kb veranschaulichte weiterhin das Entfernen der ACN-Selektionskassette während der Spermatogenese. Die Banden, die bei Probe vier bis acht oberhalb der Wildtyp- bzw. Knockin-Markierung detektiert wurden, waren auf unverdaute DNA-Fragmente zurückzuführen.

Die *Southern-Blot*-Analyse der ersten Nachkommen von *Tas1r2^{Opsin mws}* sind in Abb. 4.23 dargestellt. Die genomische DNA der Tiere wurde mit *EcoRI* verdaut und nach elektrophoretischer Auftrennung mit einer gegen das mittelwellige Opsin gerichteten Sonde (Sonde II) hybridisiert (Abb. 4.16). Bei allen Jungtieren konnte eine radioaktive Markierung bei 4,6 kb detektiert werden (Wildtyp-Allel für das mittelwellige Opsin auf Chromosom X). Bei einer (Probe 7) der acht dargestellten Proben konnte eine 6,2 kb umfassende Hybridisierungsbande identifiziert werden. Die Größe der Bande sprach für eine erfolgreiche Entfernung der ACN-Kassette bei Durchlaufen der Spermatogenese, da andernfalls eine Bande von 9,9 kb zu erwarten gewesen wäre. Neben unverdauten Fragmenten in den Proben vier bis acht konnte für Probe 7 nur eine weitere spezifische Bande neben der Wildtyp-Bande nach der Hybridisierung beobachtet werden. Dies belegt die einmalige Integration des *Targeting*-Konstruktes in die ES-Zell-DNA.

Abb. 4.24 zeigt die *Southern-Blot*-Analysen für den *Tas2r114^{Opsin sws}*-Nachwuchs. Die Hybridisierung der mit *EcoRI* verdauten genomischen DNA mit der Sonde I (Abb. 4.18) ergab ein 9,7 kb umfassendes Fragment, welches das Wildtyp-Allel des *Tas2r114*-Rezeptors repräsentierte. Für die Nachkommen 1, 3, 4 und 5 konnte weiterhin eine Hybridisierungsbande von 4,9 kb nachgewiesen werden, die anzeigt, dass diese Tiere heterozygot waren. Die Größe der *Knockin*-Bande von zirka 5 kb, anstelle von 8,6 kb, bewies, dass die ACN-Kassette in allen heterozygoten Tieren eliminiert wurde. Die Hybridisierung der genomischen DNA mit Sonde II (Abb. 4.18), die den Sequenzbereich des Opsins *sws* detektierte, führte in allen Proben zur Visualisierung einer 9,0-kb-Wildtyp-Bande (für das Wildtyp-Allel, Opsin *sws* mit Intronsequenzen auf Chromosom sechs). In den Biopsien von den Tieren 1, 4, 5 und 6 konnte weiterhin ein Fragment von zirka 4,9 kb gezeigt werden. Das Fehlen weiterer Hybridisierungsbanden bei den Proben der heterozygoten Mäuse demonstrierte, dass die *Knockin*-Kassette nur einmal in das Genom der ES-Zellen integriert war.

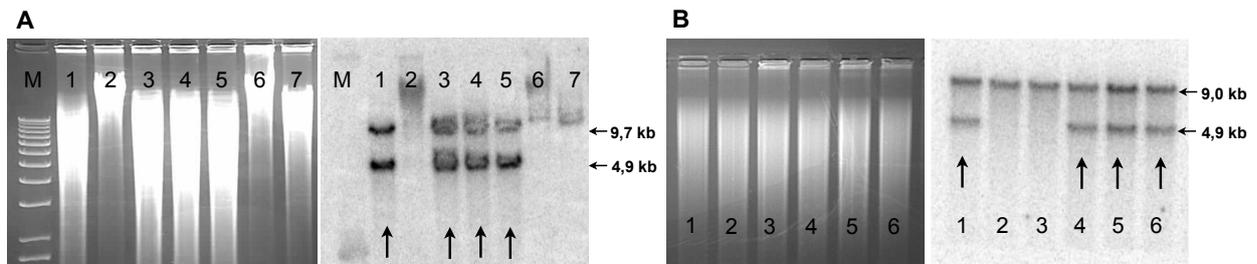


Abb. 4.24. Southern-Blot-Analyse von genomischer DNA von *Tas2r114*^{Opsin sws}-Nachkommen aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Mäusen. Genomische DNA aus Schwanzbiopsien der *Tas2r114*-Nachkommen wurde nach Isolation, Restriktionsverdau mit *EcoRI* und elektrophoretischer Auftrennung (A, B links) auf eine Nylonmembran transferiert. Diese wurde mit den Sonden I und II hybridisiert. (A) Heterozygote Nachkommen zeigten bei Hybridisierung mit Sonde I neben einer 9,7-kb-Bande, die das Wildtyp-Allel des *Tas2r114*-Rezeptors visualisierte, eine Markierung des Knockin-Allels bei 4,9 kb auf. Die Größe der Knockin-Bande bei 4,9 kb statt bei 8,6 kb veranschaulichte weiterhin das Entfernen der ACN-Selektionskassette während der Spermatogenese. (B) Hybridisierungen von *EcoRI* verdauter DNA mit Sonde II mündeten in der Detektion einer 9,0 kb und 4,9 kb umfassenden Bande. Erstere repräsentierte einen Abschnitt des Wildtyp-Allels des Chromosoms sechs, auf welchem die Maus das genomische *Opsin sws* (short wavelength sensitive) kodiert. Letztere ist auf die cDNA-Sequenz des *Opsin sws*, die durch Modifikation des *Tas2r114*-Rezeptors bedingt war, zurückzuführen. M, Marker

Heterozygote Tiere der verschiedenen Linien wurden nachfolgend mit C57BL/6 zurückgekreuzt, um einen reinen C57BL/6-Hintergrund zu erlangen.

Für erste Analysen wurden Tiere aus der N2-Generation eingesetzt. Zur Ermittlung ihrer Genotypen erfolgte nach Etablierung entsprechender PCRs die Genotypisierung mittels Amplifikation spezifischer Genabschnitte unter Einsatz einer *Taq*-Polymerase (Abb. 4.25).

Bei der Betrachtung der Verteilung der Genotypen bei bisher erfolgten Heterozygotenverpaarungen traten bei keiner der generierten Mauslinien Auffälligkeiten auf. So verteilten sich bei zehn Heterozygotenverpaarungen der Linie *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}* die Nachkommen auf 26 Wildtypen, 33 heterozygote Tiere und 19 homozygote Tiere. Bei der *Tas1r2^{Opsin mws}*-Linie ergab sich ein Verhältnis von wildtyp:heterozygot:homozygot nach sieben Verpaarungen von 14:25:18. Für den *Tas2r114^{Opsin sws}*-Nachwuchs konnte ein Verhältnis von 83:150:95 bei Analyse von 38 Verpaarungen ermittelt werden. Hieraus ließ sich ableiten, dass trotz des *Knockouts* des jeweiligen Rezeptors die Vererbung nach Mendelschen Gesetzmäßigkeiten verlief und der *Knockout* der Gene keinen Einfluss auf die Vitalität hatte.

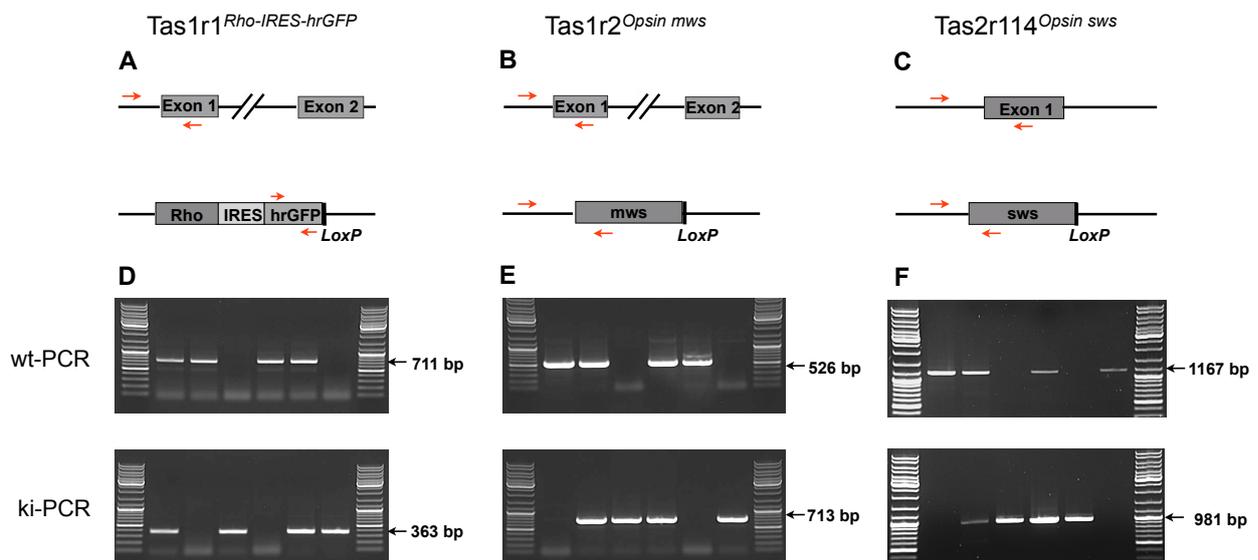


Abb. 4.25. PCR-basierte Genotypisierung der Linien *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*, *Tas1r2^{Opsin mws}* und *Tas2r114^{Opsin sws}*. Schematische Darstellung der Lage der Primer (rote Pfeile) zur Detektion des Wildtyp- bzw. Knockin-Allels in den Genotypisierungs-PCRs von *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}* (A), *Tas1r2^{Opsin mws}* (B) und *Tas2r114^{Opsin sws}* (C) sowie eine beispielhafte Illustration der PCR-Produkte nach erfolgter Agarosegelelektrophorese (D-F). Die Anordnung der Primer bedingt PCR-Produkte von (A) 711 bp für das *Tas1r1*-Wildtyp-Allel bzw. 363 bp für das *Tas1r1*-Knockin-Allel; (B) 526 bp für das *Tas1r2*-Wildtyp-Allel bzw. 713 bp für das *Tas1r2*-Knockin-Allel; (C) 1167 bp für das *Tas2r114*-Wildtyp-Allel bzw. 981 bp für das *Tas2r114*-Knockin-Allel. Die PCR-Produkte nach Agarosegelelektrophorese zeigten Banden der erwarteten Größen (D, E, F). Hieraus konnte abgeleitet werden, dass Mäuse wildtyp, heterozygot oder homozygot für die *Tas1r1*-, *Tas1r2*- bzw. *Tas2r114*-Modifikation waren. Rho, Rhodopsin; IRES, internal ribosomal entry site; hrGFP, humanized renilla green fluorescent protein; mws, medium wavelength sensitive; sws, short wavelength sensitive; wt, Wildtyp; ki, Knockin

4.4. Charakterisierung von Mausmodellen mit modifiziertem Geschmacksrezeptorslocus

Zur Überprüfung einer erfolgreichen *Targeting*-Strategie wurde der *Knockout* der Geschmacksrezeptoren und der damit einhergehende *Knockin* der Photorezeptoren in gustatorischen und nicht-gustatorischen Geweben überprüft. Hierfür wurden exemplarisch an einer C57BL/6-Maus, einer heterozygoten und einer homozygoten Maus der jeweiligen Linie die Expression der Rezeptoren mittels RT-PCR analysiert. Die mRNA-Expression von *Tas1r1*, *Tas1r2*, *Tas2r114*, *Rho*, *Opsin sws* und *mws* in linguale Geschmacksknospen wurde ferner unter Einsatz von *In-situ*-Hybridisierungen untersucht. Des Weiteren wurde die Expression der Photorezeptoren auf Proteinebene betrachtet. Die immunhistochemischen Analysen zur Ermittlung der Kolo-kalisation mit Zelltypmarkern in der Geschmacksknospe erfolgte für die *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Linie an Pilzpapillen und für die *Tas2r114^{Opsin sws}*-Linie exemplarisch in der Wallpapille, da bereits gezeigt werden konnte, dass die *Tas1r1*-Rezeptoruntereinheit vorwiegend in den Pilzpapillen (Stone *et al.*, 2007) und *Tas2rs* mehrheitlich in Wall- und Blätterpapillen exprimiert werden (Adler *et al.*, 2000). Auf eine derartige Analyse musste auf Grund fehlender funktioneller Antikörper für gustatorisches Gewebe im *Tas1r2^{Opsin mws}*-Mausmodell verzichtet werden. Die in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung gekommenen *In-situ*-Sonden und Antikörper der Opsine wurden vor Einsatz auf dem gustatorischen Gewebe einer Testhybridisierung bzw. immunhistochemischen Analyse auf Augengewebe unterzogen (Abb. 8.1 und 8.2), um ihre Funktionstüchtigkeit zu überprüfen.

4.4.1 Charakterisierung des *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Mausmodells

Der *Tas1r1*-Rezeptor stellt eine Untereinheit des Umamirezeptors dar, der nach Dimerisierung mit *Tas1r3* an der Wahrnehmung von L-Glutamat beteiligt ist. Für die Expressionsuntersuchungen des modifizierten *Tas1r1*-Locus wurde neben den Analysen für die Umami-Rezeptoruntereinheit *Tas1r1* und das Opsin, hier *Rho*, auch das eingebrachte stationäre Markerprotein *hrGFP* betrachtet. Die Proteinanalysen für dieses Mausmodell erfolgten vorrangig über die *hrGFP*-Fluoreszenz.

4.4.1.1 PCR-Analysen von Geweben der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

Um die Expression des *Tas1r1*-Rezeptors im Organismus der Maus und dessen erfolgreichen *Knockout* unter Einbringung von *Rho* und *hrGFP* im *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Modell zu bestätigen, wurde cDNA von 29 gustatorischen und nicht-gustatorischen Geweben einer C57BL/6-, einer heterozygoten und einer homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus analysiert (zusammenfassend dargestellt in Tab. 4.11). Die Qualität der cDNA wurde mittels PCR anhand des *house keeping gene* β -Aktin überprüft (Abb. 8.3). Die Amplifikation von β -Aktin auf den verschiedenen +RT-cDNA-Proben führte zu einem PCR-Produkt von 441 bp. Eine Kontamination der cDNA mit genomischer DNA wäre durch ein PCR-Produkt von 895 bp angezeigt worden, das in keiner der analysierten Proben sichtbar war. Einzig das PCR-Produkt der mitgeführten genomischen DNA

wies die entsprechende Größe auf. Nach Überprüfung der cDNA-Präparationen wurden diese anschließend für die Analyse des Tas1r1- und Rho-Rezeptors sowie für hrGFP herangezogen. Die Amplifikation des Tas1r1-Rezeptors führte in allen analysierten Geweben der C57BL/6-Maus mit Ausnahme des braunen Fettgewebes, Dickdarms und Pankreas und des heterozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Tieres bis auf Blut und Duodenum zu einem PCR-Produkt (Abb. 8.3). Neben einem 375 bp großen Amplifikationsprodukt konnte weiterhin in zahlreichen Geweben Banden der Größe ~ 675 bp und ~ 750 bp beobachtet werden. Sequenzierungen dieser Banden zeigten, dass es dabei um Spleißvarianten der Tas1r1-cDNA handelte. Das 375 bp umfassende PCR-Produkt konnte als Sequenzabschnitt von Exon drei und vier ohne Intron identifiziert werden, während das 754 bp umfassende PCR-Produkt die genomische Sequenz des Tas1r1-Rezeptors, das heißt Exon drei, Intron drei und Exon vier (nicht prozessierte cDNA) widerspiegelte. Eine Expression der Umami-Rezeptoruntereinheit in Geweben der homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus war nicht feststellbar. Für den Nachweis der Rho-Sequenz verhielt es sich genau umgekehrt. Hier konnte kein PCR-Produkt in C57BL/6-Geweben detektiert werden, jedoch in der Mehrzahl der analysierten Organe der heterozygoten und in allen untersuchten Geweben mit Ausnahme von Blut und Pankreas der homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus (Abb. 8.3). Das spezifisch amplifizierte PCR-Produkt aus muriner cDNA umfasste 597 bp. Als Positivkontrollen für die Amplifikation des humanen Rho wurde cDNA des Auges und genomische DNA des Menschen herangezogen. Da die ausgewählten Oligonukleotide Intronsequenzen umspannten, bedingte die Wahl der Primer ein PCR-Produkt von 597 bp für die humane cDNA als Matrize und eine Bande der Größe 3584 bp im Fall der humanen genomischen DNA. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich auch für die kodierende Sequenz des Fluoreszenzproteins hrGFP. Das PCR-Produkt von 368 bp war ausschließlich von cDNA der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Tiere amplifizierbar, jedoch nicht von cDNA der C57BL/6-Maus (Abb. 8.3). Hierbei exprimierten alle untersuchten Gewebe hrGFP-mRNA. Als Kontrolle für die Amplifikation des hrGFP kam genomische DNA der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus zum Einsatz, die folglich ebenfalls ein PCR-Produkt von 368 bp aufzeigte. Die –RT-cDNA-Proben wiesen in keinem der analysierten Gewebe PCR-Fragmente, die eine genomische Kontamination anzeigen, auf.

Tab. 4.11. PCR-Analyse gustatorischer und nicht-gustatorischer Gewebe der C57BL/6- und Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus. Nach Isolation der RNA aus 29 Geweben von C57BL/6 und heterozygoten bzw. homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Mäusen im Alter von fünf bis zwölf Wochen wurden diese in cDNA umgeschrieben und als Matrize für die Amplifikation von Genabschnitten von β -Aktin, Tas1r1, Rhodopsin (Rho) und hrGFP (humanized renilla green fluorescent protein) herangezogen. +, Expression; -, keine Expression; NID, Ductus incisivus; VNO, Vomeronasalorgan (Jacobson-Organ)

Gewebe	Tier	C57BL/6			heterozygot Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}			homozygot Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}		
		Tas1r1	hRho	hrGFP	Tas1r1	hRho	hrGFP	Tas1r1	hRho	hrGFP
Blut		+	-	-	-	-	+	-	-	+
Herz		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Lunge		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Leber		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Niere		+	-	-	+	+	+	-	+	+

Gewebe	Tier	C57BL/6			heterozygot Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}			homozygot Tas1r1 ^{Rho-IRES-hrGFP}		
		Tas1r1	hRho	hrGFP	Tas1r1	hRho	hrGFP	Tas1r1	hRho	hrGFP
Milz		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Thymus		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Lymphknoten		+	-	-	+	+	+	-	+	+
weißes Fettgewebe		+	-	-	+	+	+	-	+	+
braunes Fettgewebe		-	-	-	+	+	+	-	+	+
Hoden		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Nebenhoden (Kopf)		+	-	-	+	-	+	-	+	+
Nebenhoden (Schwanz)		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Oberschenkelmuskel		+	-	-	+	-	+	-	+	+
Auge		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Nasenepithel		+	-	-	+	+	+	-	+	+
VNO		+	-	-	+	+	+	-	+	+
anteriore Zunge		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Blätterpapillen		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Wallpapille		+	-	-	+	+	+	-	+	+
NID		+	-	-	+	+	+	-	+	+
weicher Gaumen		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Speiseröhre		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Magen		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Duodenum		+	-	-	-	-	+	-	+	+
Jejunum		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Ileum		+	-	-	+	+	+	-	+	+
Dickdarm mit Caecum		-	-	-	+	+	+	-	+	+
Pankreas		-	-	-	+	-	+	-	-	+

4.4.1.2 *In-situ*-Hybridisierungen von Zungengewebe der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

Die Analyse der Tas1r1-Expression mittels *In-situ*-Hybridisierung erfolgte an Kryoschnitten von perfundiertem Zungengewebe von C57BL/6- und homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Mäusen. Die Untersuchung wurde an Pilzpapillen, die sich durch eine starke Tas1r1-Expression auszeichnen, durchgeführt. Die Hybridisierung von C57BL/6-Kryoschnitten mit der komplementären (*antisense*, as) Tas1r1-Sonde markierte zahlreiche Knospen der Zungenspitze. Im homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Tier hingegen war keine Expression nachweisbar. Analysen mit Rho-as-Sonden ergaben keine Signale in Pilzpapillen der C57BL/6-Maus, vereinzelt wurden jedoch positive Geschmacksknospen in den Pilzpapillen der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus detektiert. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Hybridisierung mit der hrGFP-as-Sonde beobachtet. Hier führte jedoch die Verwendung der as-Sonde häufiger zu deutlicheren, das heißt intensiveren Markierungen zellulärer Strukturen in den Pilzpapillen des homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Tieres. Die Hybridisierung mit den *sense*-Sonden von Tas1r1, Rho und hrGFP ergab weder in Pilzpapillen der C57BL/6- noch der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus Signale. Folglich ließ sich der Tas1r1-Rezeptor nur in Pilzpapillen der C57BL/6-Maus und die mRNA-Sequenz des humanen Rho und hrGFPs nur in Tieren der Linie Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}

nachweisen. Eine Hybridisierung von Gewebeschnitten der Zungenspitze beider Mausmodelle mit einer Gustducin-as-Sonde führte jeweils in etwa jeder dritten Pilzpapille zu einer starken Markierungen der Geschmacksknospe. Die Verwendung der *sense*-Sonde zeigte die Spezifität der Hybridisierung (Abb. 4.26).

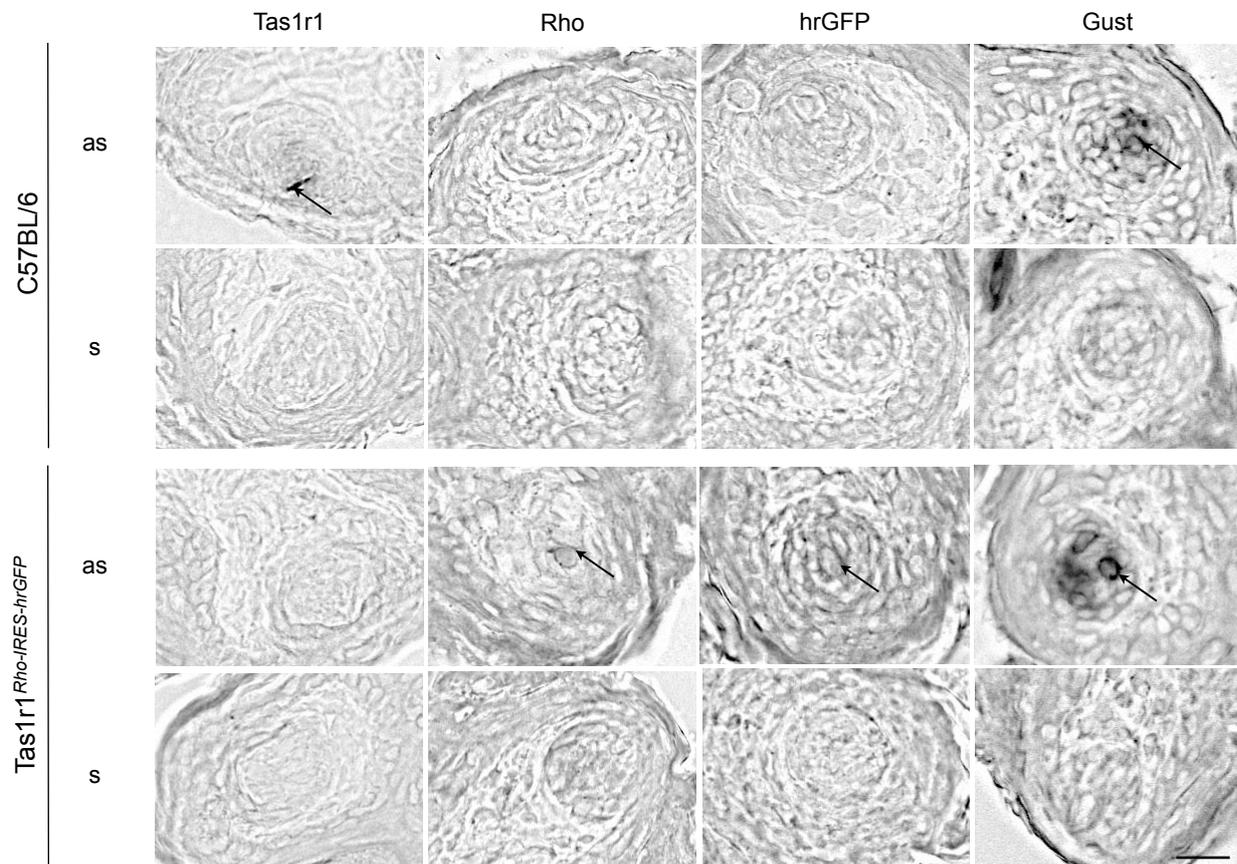


Abb. 4.26. RNA-Expressionsanalyse mittels In-situ-Hybridisierung an Pilzpapillen der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus im Vergleich zu *C57BL/6*-Tieren. Für die Expressionsanalyse der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Linie wurden Gewebeschnitte (14 μ m) der Zungenspitze von homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*- im Vergleich zu *C57BL/6*-Tieren mit *Tas1r1*-, Rhodopsin (*Rho*)- und humanized renilla green fluorescent protein-(*hrGFP*)-Sonden hybridisiert. Die Hybridisierung mit der Sonde *Tas1r1* antisense (*as*) führte zu Markierungen von Zellen in den Pilzpapillen der *C57BL/6*-Maus, jedoch nicht in Gewebeschnitten der homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus. Gegenteilig verhielt es sich bei der Hybridisierung mit den As-Sonden für *Rho* und *hrGFP*. Hier bedingte die Anlagerung der komplementären Sonden an die mRNA im Gewebe die vereinzelt Markierung von Pilzpapillen in der homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus. Eine Hybridisierung der As-Sonden im Gewebe der *C57BL/6*-Maus war nicht erkennbar. Die Hybridisierung von Gewebeschnitten beider Mausmodelle mit einer gegen Gustducin (*Gust*) gerichteten *as*-Sonde bedingte vergleichbare Ergebnisse in Intensität und Häufigkeit in den Pilzpapillen von *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}* und *C57BL/6*. Die *sense*-(*s*)-behandelten Schnitte blieben frei von Signalen. Pfeile zeigen exemplarisch auf mRNA-Markierungen in den Geschmacksknospen der Pilzpapille. Maßstab: 10 μ m.

4.4.1.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Geschmackspapillen homozygoter *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Nachkommen

Der Nachweis der Modifikation des *Tas1r1*-Locus auf Proteinebene erfolgte mittels immunhistochemischen Untersuchungen an Kryoschnitten homozygoter *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Mäuse. Basierend auf der Integration des stationären Markers hrGFP unter der Kontrolle des *Tas1r1*-Promotors konnte das hrGFP-Protein in Gewebeschnitten dieser Linie durch Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm betrachtet werden. Die Analyse von 14- μ m-Kryoschnitten von Pilz-, Blätter- und Wallpapille sowie des weichen Gaumens und des NIDs am konfokalen *Laserscan*-Mikroskop ergab, dass alle gustatorischen Areale der Mundhöhle bis auf die Blätterpapillen hrGFP-Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 4.27). Das Ausmaß der hrGFP-Fluoreszenz variierte jedoch stark zwischen den einzelnen Papillen. Während in Gewebeschnitten zweier betrachteter Wallpapillen homozygoter *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Mäuse jeweils nur eine Zelle pro Papille positiv war, konnte mindestens in jeder zweiten Pilzpapille der Zungenspitze eine hrGFP-Fluoreszenz wahrgenommen werden.

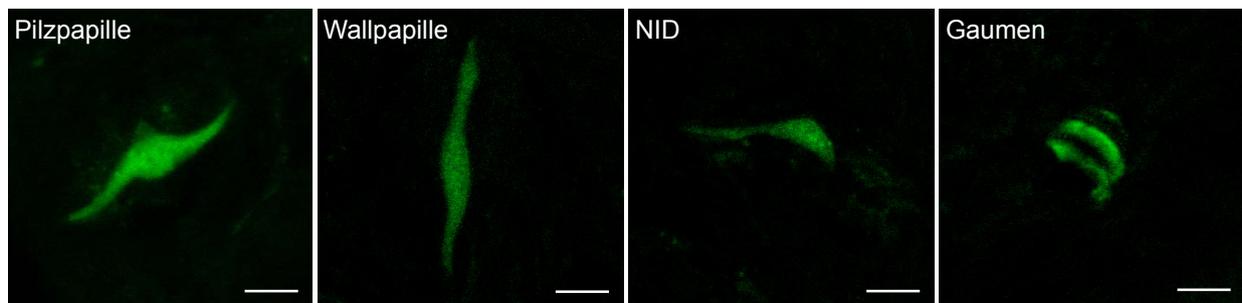


Abb. 4.27. hrGFP-(*Tas1r1*)-exprimierende Zellen in den Geschmacksknospen der Mundhöhle der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus. Dargestellt ist die Fluoreszenz des humanized renilla green fluorescent protein (hrGFP; grün) in Kryoschnitten (14 μ m) einer Pilz- und Wallpapille sowie in Geschmacksknospen des weichen Gaumens und der Papilla incisiva (NID) homozygoter Tiere der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Linie nach Laseranregung bei 488 nm mittels konfokaler *Laserscan*-Mikroskopie. Maßstab: 10 μ m.

Die Isolation von Zungenepithel zweier homozygoter *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Mäuse und Auswertung am Mirax-Scansystem ergab, dass die zwei untersuchten Mäuse im Mittel 83 Pilzpapillen auf ihrer Zungenoberfläche trugen, von denen 27 eine hrGFP-Fluoreszenz aufwiesen. Dies entsprach einem Anteil an hrGFP-positiven Pilzpapillen von 32 %. Dabei konnte eine eindeutige Häufung der hrGFP-Fluoreszenz in Pilzpapillen der Zungenspitze im Vergleich zum posterioren Teil der Zunge beobachtet werden.

Um die Proteinexpression der zweiten in die *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus eingebrachten Sequenz zu analysieren, wurde eine Antikörperfärbung für humanes Rho auf Paraffinschnitten von Pilzpapillen vorgenommen. Mittels konfokaler *Laserscan*-Mikroskopie konnte jedoch nur in etwa jeder zehnten Papille ein Nachweis für Rho in Gewebeschnitten der Pilzpapillen homozygoter Tiere detektiert werden. Die Identifikation von Rho-positiven Zellen ging dabei zu 100 % mit einer Kolokalisation der hrGFP-Fluoreszenz des *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Gewebes einher (Abb. 4.28). Eine Detektion von Rho oder einer Eigenfluoreszenz nach Anregung mit Licht von

488 nm in gleichartig behandelten Gewebeschnitten von Pilzpapillen der C57BL/6-Maus wurde nicht beobachtet.

Auf Grund der schwachen Nachweisbarkeit von Rho und der 100 %igen Kolo-kalisation mit hrGFP wurde in der nachfolgenden Analyse mit verschiedenen Zelltypmarkern der Geschmacksknospenzellen lediglich die Expression der Zelltypmarker im Vergleich zur hrGFP-Fluoreszenz betrachtet.

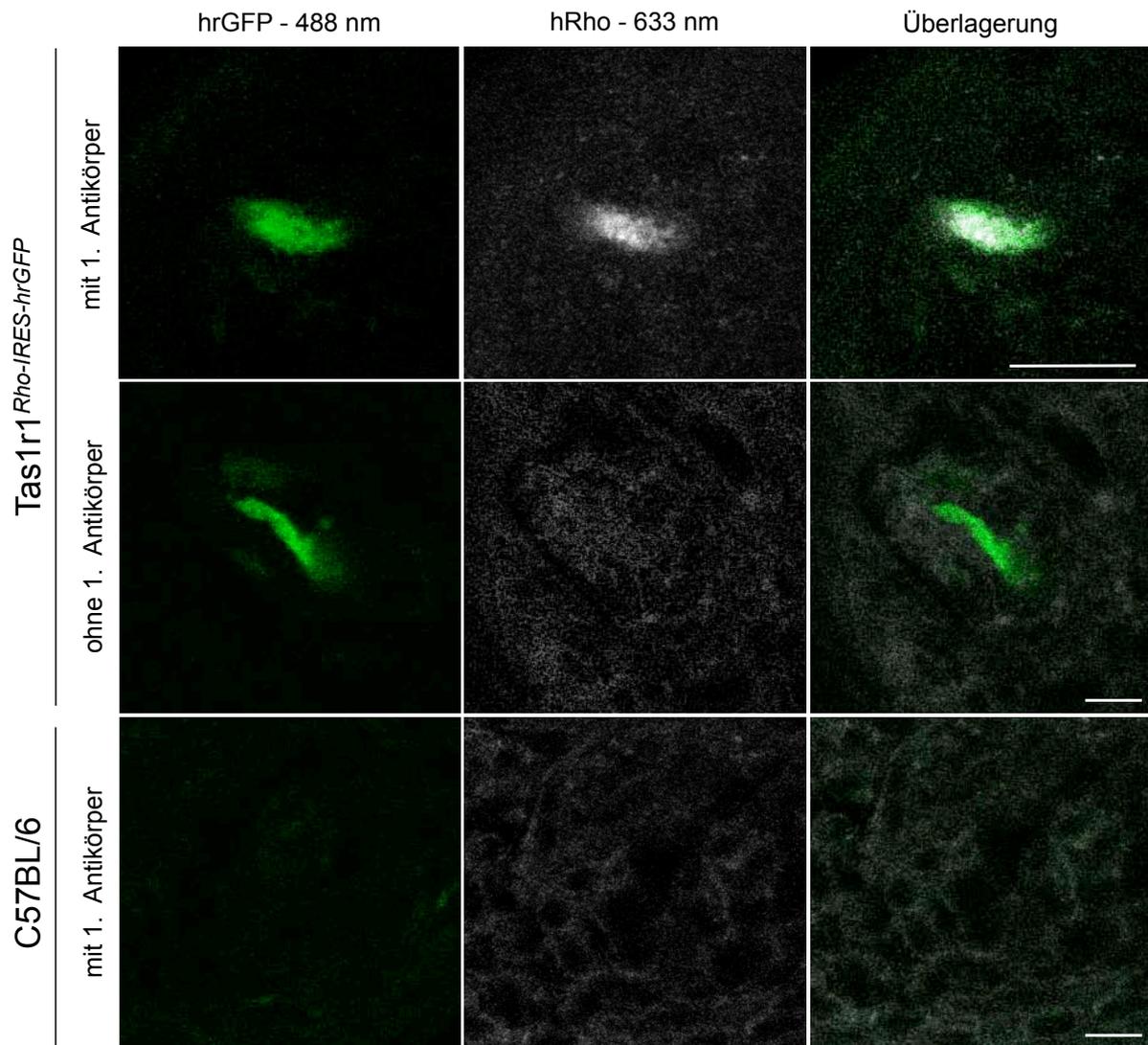


Abb. 4.28. Immunhistochemischer Nachweis von Rho in Pilzpapillen der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Maus. Fluoreszenzaufnahmen einer Ebene von Kryopräparaten (14 μ m) nach einer Antikörperfärbung gegen humanes Rhodopsin (Rho). Die Gewebeschnitte der homozygoten Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Zungenspitze zeigten teilweise Markierungen von zellulären Strukturen in den Pilzpapillen. Jene konnten nicht bei Gewebeschnitten, die ohne ersten Antikörper behandelt wurden, oder bei der C57BL/6-Maus beobachtet werden. Bei gleichzeitiger Laseranregung mit 488 nm konnte in den Kryoschnitten der Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Pilzpapillen zusätzlich die hrGFP-Fluoreszenz detektiert werden. Maßstab: 10 μ m. hrGFP, humanized renilla green fluorescent protein

Für die Zuordnung der hrGFP-Fluoreszenz zu einem speziellen Zelltyp in der Geschmacksknospe, wurden Zungenspitzen der homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus geschnitten und Antikörperfärbungen für die Typ-I-, Typ-II-, bzw. Typ-III-Zellmarker NTPDase 2, PLC β 2 und AADC durchgeführt. Diese zeigten, dass hrGFP-positive Zellen nicht mit NTPDase 2- oder AADC-positiven Zellen kolokalisieren. Lediglich PLC β 2-positive Zellen wiesen eine teilweise Überlappung mit der hrGFP-Fluoreszenz auf (Abb. 4.29). Die hrGFP-positiven Zellen (*Tas1r1*-exprimierende Zellen) stellen folglich eine Unterpopulation der PLC β 2-positiven Zellen dar.

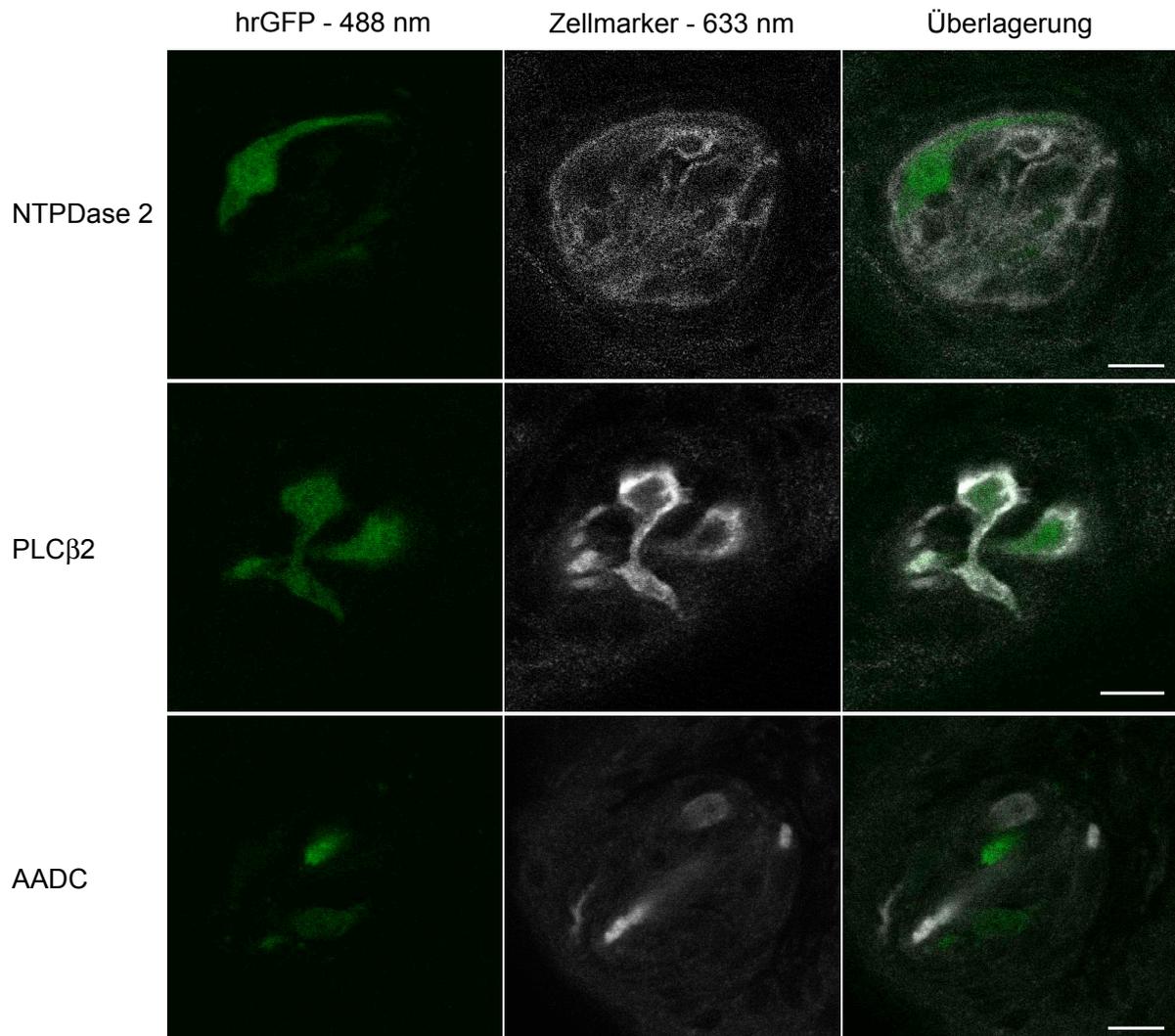


Abb. 4.29. Immunhistochemische Analysen zur Koexpression des Fluoreszenzproteins hrGFP mit Zelltypmarkern der Geschmacksknospe in Pilzpapillen der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus. Fluoreszenzaufnahmen von Kryoschnitten (14 μ m) nach Antikörperfärbung für nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase 2), Phospholipase C β 2 (PLC β 2) und L-aromatic acid decarboxylase (AADC). Eine zeitgleiche Anregung der Gewebeschnitte mit Licht der Wellenlänge 633 nm (für Zelltypmarker; weiß) und 488 nm (für Fluoreszenzprotein humanized renilla green fluorescent protein, hrGFP, grün) zeigte, dass einzig die Färbung mit dem gegen PLC β 2 gerichteten Antikörper eine Kolokalisation beider im Laserscan-Mikroskop detektierten Fluoreszenzen bedingt. Maßstab: 10 μ m.

4.4.2 Charakterisierung des *Tas1r2^{Opsin mws}*-Mausmodells

Der *Tas1r2*-Rezeptor bildet zusammen mit dem *Tas1r3*-Rezeptor einen funktionellen Süßrezeptor. Dieser wird vorrangig in der Wall- und den Blätterpapille der Maus exprimiert und ist im Fall des hier analysierten modifizierten Mausmodells durch die kodierende Sequenz des *Opsin mws* der Maus ersetzt worden.

4.4.2.1 PCR-Analysen von Geweben der *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

Die Expression des *Tas1r2*- und des Photorezeptors *Opsin mws* wurde in gustatorischen und nicht-gustatorischen Geweben einer C57BL/6, einer heterozygoten und einer homozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus untersucht (Tab. 4.12). Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle der cDNA mittels β -Aktin-PCR (Abb. 8.4; siehe Abschnitt 4.4.1.1) wurde die Expression von *Tas1r2* und *Opsin mws* analysiert.

Die Amplifikation des *Tas1r2*-Rezeptors von C57BL/6-cDNA führte in 15 von 29 Geweben zur Detektion einer spezifischen Bande von 912 bp. In neun dieser Gewebe (Nebenhoden, Auge, Nasenepithel, Zungenspitze, Wall- und Blätterpapille(n), Gaumen, Speiseröhre und Jejunum) konnte die Expression der *Tas1r2*-mRNA ebenfalls im heterozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tier gezeigt werden (Abb. 8.4). In einer homozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus konnte das spezifische 912 bp lange *Tas1r2*-Produkt nicht amplifiziert werden. Jedoch traten hier, wie auch bei der Analyse der cDNA vom C57BL/6- und dem heterozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tier, vereinzelt unspezifische Nebenbanden von ~ 300 bp und ~ 500 bp auf. Eine Überprüfung der Sequenz dieser PCR-Produkte ergab keine Übereinstimmung mit der *Tas1r2*-Sequenz. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion wurde genomische DNA eingesetzt, deren Amplifikat eine Größe von 2329 bp hatte. *Opsin mws*, der bei der Maus auf Chromosom X kodiert ist, war im Nebenhoden und im Auge der C57BL/6-Maus nachweisbar, veranschaulicht durch das Auftreten einer 383 bp umfassenden PCR-Bande (Abb. 8.4). Im heterozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tier konnte neben diesen Organen die *Opsin*-mRNA auch im Nasenepithel, der Zungenspitze und bei erhöhtem *Template*-Einsatz (2 μ l statt 1 μ l) ebenfalls in der Niere und der Blätterpapille detektiert werden. Im homozygoten Tier war die cDNA für *Opsin mws* in Hoden, Nebenhoden, Auge, Vomeronasalorgan, Zungenspitze, Wallpapille, NID, Gaumen, Speiseröhre und den verschiedenen Abschnitten des Dünndarms nachweisbar. Abermals gelang auch hier bei Verdoppelung der cDNA-Menge der Nachweis der Expression in der Niere. Als Positivkontrolle wurde hier ebenfalls auf genomische DNA der C57BL/6-Maus zurückgegriffen. Das beobachtete PCR-Produkt wies eine Größe von 3860 bp auf. Bei allen durchgeführten PCR-Reaktionen blieb die $-RT$ -cDNA frei von Amplifikaten.

Tab. 4.12. PCR-Analyse gustatorischer und nicht-gustatorischer Gewebe der C57BL/6- und Tas1r2^{Opsin mws}-Maus. Nach Isolation der RNA aus Geweben der C57BL/6- und heterozygoten bzw. homozygoten Tas1r2^{Opsin mws}-Maus im Alter von fünf bis zwölf Wochen wurde diese in cDNA umgeschrieben und als Ausgangsmaterial für die Amplifikation von Genabschnitten von β -Aktin, Tas1r2 und Opsin mws (medium wavelength sensitive) herangezogen. + Expression; - keine Expression; - (+), eine Steigerung der Matrizenmenge bedingte die Visualisierung der Expression; NID, Ductus incisivus; VNO, Vomeronasalorgan (Jacobson-Organ)

Gewebe	Tier	C57BL/6		heterozygot Tas1r2 ^{Opsin mws}		homozygot Tas1r2 ^{Opsin mws}	
		Tas1r2	mws	Tas1r2	mws	Tas1r2	mws
Blut		-	-	-	-	-	-
Herz		-	-	-	-	-	-
Lunge		+	-	-	-	-	-
Leber		+	-	-	-	-	-
Niere		+	-	-	- (+)	-	- (+)
Milz		-	-	-	-	-	-
Thymus		+	-	-	-	-	-
Lymphknoten		-	-	-	-	-	-
weißes Fettgewebe		-	-	-	-	-	-
braunes Fettgewebe		-	-	-	-	-	-
Hoden		-	-	-	-	-	+
Nebenhoden (Kopf)		+	+	+	+	-	+
Nebenhoden (Schwanz)		-	+	-	+	-	+
Oberschenkelmuskel		+	-	-	-	-	-
Auge		+	+	+	+	-	+
Nasenepithel		+	-	+	+	-	+
VNO		-	-	-	-	-	-
anteriore Zunge		+	-	+	+	-	+
Blätterpapillen		+	-	+	- (+)	-	+
Wallpapille		+	-	+	-	-	+
NID		+	-	-	-	-	+
weicher Gaumen		+	-	+	-	-	+
Speiseröhre		+	-	+	-	-	+
Magen		-	-	-	-	-	-
Duodenum		- (+)	-	-	-	-	+
Jejunum		+	-	+	-	-	+
Ileum		-	-	-	-	-	+
Dickdarm mit Caecum		-	-	-	-	-	-
Pankreas		-	-	-	-	-	-

4.4.2.2 *In-situ*-Hybridisierungen von Zungengewebe der Tas1r2^{Opsin mws}-Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

Der RNA-Nachweis des Tas1r2-*Knockouts* und Opsin-mws-*Knockins* im Tas1r2^{Opsin mws}-Modell wurde auf zellulärer Ebene mittels *In-situ*-Hybridisierung erbracht und mit Gewebeschnitten der C57BL/6-Maus verglichen. Die Hybridisierung von Gewebeschnitten der Wallpapille der C57BL/6-Maus mit der Tas1r2-as-Sonde führte zu gefärbten Zellen in nahezu jeder Geschmacksknospe der Papille. Die Hybridisierung der Wallpapillen von heterozygoten Tas1r2^{Opsin mws}-Tieren mit der as-Sonde führte im Vergleich hierzu zu einer deutlichen Reduktion markierter Zellen. In Gewebeschnitten der homozygoten Tas1r2^{Opsin mws}-Maus war hingegen keine Färbung in den Wallpapillen nachweisbar (Abb. 4.30). Das in die Maus eingebrachte Opsin mws war nicht in Zungenschnitten der C57BL/6-Maus detektierbar. Die Hybridisierung von Gewebeschnitten der Wallpapille heterozygoter Tas1r2^{Opsin mws}-Tiere mit der Opsin-mws-as-Sonde führte demgegenüber zur Markierung vereinzelter Zellen. Die Anzahl der positiven Opsin-mws-Zellen war in den Wallpapillen homozygoter Tas1r2^{Opsin mws}-Mäuse noch größer (Abb. 4.30). Eine Auszählung positiver Signale für Tas1r2-as auf C57BL/6-Gewebe und Opsin-mws-as auf homozygoten Tas1r2^{Opsin mws}-Gewebeschnitten zeigte keine gravierenden Unterschiede in der Expression. So lag die Anzahl Tas1r2- positiver Zellen je Graben der Wallpapille einer C57BL/6-Maus bei durchschnittlich $13,5 \pm 4,5$ Zellen. In einer homozygoten Tas1r2^{Opsin mws}-Maus konnten demgegenüber $10,8 \pm 2,8$ Zellen pro Graben der Wallpapille als Opsin-mws-positiv ermittelt werden.

Der Nachweis von Tas1r2 in C57BL/6-Mäusen und Opsin mws in homozygoten Tas1r2^{Opsin mws}-Tieren mit den jeweiligen As-Sonden gelang ebenfalls in den Blätterpapillen der Mäuse, während Tas1r2-as auf homozygoten Tas1r2^{Opsin mws}- und Opsin-mws-as auf C57BL/6-Gewebeschnitten keine Geschmackszellen markierte (Daten nicht gezeigt). In einigen Fällen konnte die mRNA-Expression der Süß-Rezeptoruntereinheit Tas1r2 auch in den Pilzpapillen der C57BL/6-Maus detektiert werden. Ein Nachweis der Opsin-mws-Expression in Pilzpapillen homozygoter Tas1r2^{Opsin mws}-Mäuse konnte nicht erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass Tas1r2 in gustatorischen Geweben der C57BL/6-Maus nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch Opsin mws. Die Opsin-mRNA konnte allerdings in Geweben der Tas1r2^{Opsin mws}-Maus detektiert werden.

Weiterhin wurden Gewebeschnitte der C57BL/6- und Tas1r2^{Opsin mws}-Wallpapille mit einer gegen Gustducin gerichteten Sonde hybridisiert. Die As-Sonde führte unabhängig vom Genotyp jeweils zu starken Markierungen fast jeder Geschmacksknospe in den betrachteten Wallpapillen.

Demgegenüber wies keiner der mit den *sense*-Sonden behandelten Gewebeschnitte eine Markierung von Zellen in den Geschmacksknospen auf (Abb. 4.30).

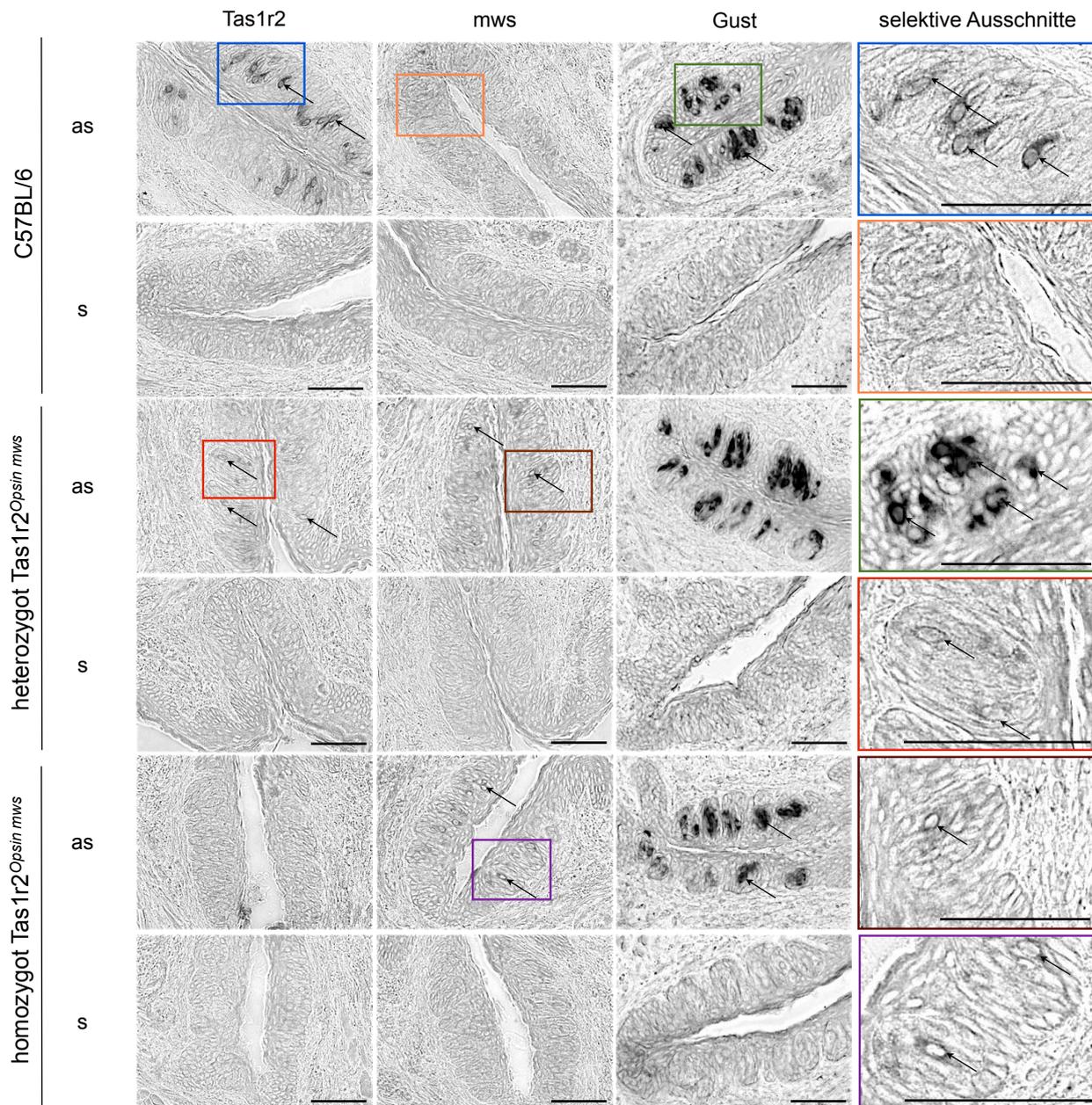


Abb. 4.30. RNA-Expressionsanalyse mittels In-situ-Hybridisierung an Wallpapillen der *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus im Vergleich zu C57BL/6-Maus. Für die Analyse des *Tas1r2*-Knockouts unter Knockin des Opsin *mws* (medium wavelength sensitive) wurden hetero- und homozygote Tiere der *Tas1r2^{Opsin mws}*-Linie im Vergleich zu C57BL/6-Tieren unter Zuhilfenahme von *Tas1r2*- und Opsin-*mws*-in-situ-Hybridisierungssonden untersucht. Die Hybridisierung von Schnitten der Wallpapille (14 μ m) mit der antisense-(as)-Sonde von *Tas1r2* führte zu deutlichen Markierungen von Geschmacksknospen der C57BL/6-Maus. Im heterozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tier konnte ebenfalls eine *Tas1r2*-Expression nachgewiesen werden, wenn auch deutlich schwächer als im C57BL/6-Tier. Eine Markierung von *Tas1r2*-mRNA mittels In-situ-Hybridisierung im homozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tier erfolgte nicht. Die Hybridisierung der Gewebeschnitte der Wallpapille mit der as-Sonde für Opsin *mws* hingegen mündete in keiner nachweisbaren Expression des Opsins im C57BL/6-Tier, in einer vereinzelt Markierung in Gewebeschnitten der heterozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus und in einer deutlichen Markierung von Zellen in der Wallpapille eines homozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tieres. Die Hybridisierung von Gewebeschnitten der Wallpapille mit einer gegen Gustducin (*Gust*) gerichteten as-Sonde bedingte vergleichbare Markierungen von Zellen in den Wallpapillen von *Tas1r2^{Opsin mws}* und C57BL/6, die ebenfalls in ähnlicher Häufigkeit auftraten. Die sense-(s)-behandelten Schnitte blieben frei von Signalen. Pfeile zeigen exemplarisch auf mRNA-Markierungen in den Geschmacksknospen der Pilzpapille. Maßstab: 35 μ m.

4.4.2.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Geschmackspapillen homozygoter *Tas1r2^{Opsin mws}*-Nachkommen

Der Proteinnachweis zur Manipulation des *Tas1r2*-Locus in der *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus sollte über einen gegen das mittelwellige Opsin der Maus gerichteten Antikörper erfolgen. Für die Überprüfung der Funktionalität dieser wurden Gewebeschnitte des Auges angefertigt und einem immunhistochemischen Protokoll unterzogen. Die Opsine, die im Auge vorkommen, konnten hierbei stets in einzelnen Zapfen in der Retina detektiert werden (Abb. 8.2). Eine Übertragung des Protokolls auf Gewebeschnitte der Zunge hingegen führte zu keinem positiven Ergebnis. Die beobachtete schwache Markierung von Geschmacksknospen der Wallpapille in homozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Tieren wich kaum bei einem der getesteten Antikörper von der gleichartig behandelten Gewebeschnitte der C57BL/6-Maus ab. Auch Optimierungsversuche des Protokolls bezüglich Blockierreagenzien sowie die Integration von Erhitzungs- oder Amplifikationsschritten brachten keinen Erfolg. Auf den Proteinnachweis für Opsin *mws*, welches im betrachteten Mausmodell unter der Kontrolle des *Tas1r2*-Promotors exprimiert wird, musste zunächst verzichtet werden.

4.4.3 Charakterisierung des *Tas2r114^{Opsin sws}*-Mausmodells

Der Rezeptor *Tas2r114* ist einer der 35 Rezeptoren der Maus, die an der Vermittlung des Bittergeschmacks beteiligt sind. In dem hier generierten Mausmodell ist die kodierende Sequenz des GPCR durch ein im UV-Bereich des Spektrums sensitives Opsin der Maus ersetzt worden. Das Anregungsmaxima des Photorezeptors beträgt 359 nm. Es wird unter Kontrolle des *Tas2r114*-Promotors in dieser Mauslinie exprimiert.

4.4.3.1 PCR-Analysen von Geweben der *Tas2r114^{Opsin sws}*-Maus im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

Die Expression der mRNA des Bitterrezeptors *Tas2r114* und des Photorezeptors Opsin *sws*, der in dem betrachteten Mausmodell unter der Kontrolle der endogenen Opsin-*sws*- und *Tas2r114*-Promotoren stand, sollte in verschiedenen gustatorischen und nicht-gustatorischen Geweben analysiert werden (Tab. 4.13). Hierfür wurden aus Geweben einer C57BL/6-, einer heterozygoten und einer homozygoten *Tas2r114^{Opsin sws}*-Maus, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Qualität wurde mittels PCR auf das β -Aktin-Gen überprüft (Abb. 8.5; siehe Abschnitt 4.4.1.1). Nach Überprüfung der Qualität der cDNA wurde diese als Matrize für die Amplifikation von *Tas2r114* und Opsin *sws* eingesetzt.

Der Nachweis der mRNA des Bitterrezeptors *Tas2r114* auf cDNA der C57BL/6-Maus gelang im Thymus, im Hoden, im Nasenepithel und Vomeronasalorgan, in Wall- und Blätterpapille, im NID und im Gaumen (Tab. 4.13). Bei Nutzung der cDNA aus einer heterozygoten *Tas2r114^{Opsin sws}*-Maus als Ausgangsmaterial für die PCR war die *Tas2r114*-mRNA nur noch in Thymus, Hoden, Wall- und Blätterpapille sowie im Gaumen amplifizierbar. Bei Einsatz der doppelten Matrizenmenge konnte weiterhin auch für das Nasenepithel ein PCR-Produkt detektiert werden. Eine Amplifikation des Rezeptors von cDNA eines homozygoten *Tas2r114^{Opsin sws}*-Tieres war

nicht möglich. Ebenso wiesen alle –RT-Proben kein Amplifikationsprodukt auf. Als Positivkontrolle kam genomische DNA einer C57BL/6-Maus zu Einsatz. Bedingt durch die intronfreie Sequenz der Bitterrezeptoren war die Größe der PCR-Produkte auf cDNA und genomischer DNA jeweils 535 bp (Abb. 8.5). Die Analyse der Expression von Opsin sws belegte, dass der Photorezeptor in Wildtyp-Mäusen in den analysierten Geweben ausschließlich im Thymus und Auge exprimiert war, was an der Detektion eines 400 bp großen PCR-Produktes deutlich wurde. Bei Verwendung der cDNA einer heterozygoten Tas2r114^{Opsin sws}-Maus als Ausgangsmaterial konnte darüber hinaus das kurzwellige Opsin in Hoden, Wall- und Blätterpapille sowie Gaumen nachgewiesen werden. Eine Expression des Photorezeptors im nasalen Epithel der Maus war nur mit Erhöhung der Matrizenmenge möglich. Im homozygoten Tas2r114^{Opsin sws}-Tier war die cDNA für Opsin sws im Thymus, Hoden, Auge, Wallpapille, NID und Gaumen nachweisbar. Abermals gelang auch hier nur bei Verdoppelung der Matrizen-Menge der Beleg für die Expression in weiteren Organen wie Blätterpapillen, Vomeronasalorgan und Nasenepithel (Tab. 4.13). Die Amplifikation des cDNA-Fragmentes von Opsin sws ging dabei oftmals mit der Detektion eines zusätzlichen PCR-Fragmentes mit genomischer Länge (582 bp) einher (Abb. 8.5). Als Positivkontrolle wurde genomische DNA der C57BL/6-Maus eingesetzt. Die Kontroll-PCR-Reaktionen (–RT) waren jeweils negativ.

Tab. 4.13. PCR-Analyse gustatorischer und nicht-gustatorischer Gewebe der C57BL/6- und Tas2r114^{Opsin sws}-Maus. Isolierte RNA aus Geweben einer C57BL/6-, einer heterozygoten und einer homozygoten Tas2r114-Maus im Alter von fünf bis zwölf Wochen wurde in cDNA umgeschrieben und als Matrize für die Amplifikation von β -Aktin-, Tas2r114- und Opsin sws-(short wavelength sensitive)-Genabschnitten eingesetzt. + Expression; - keine Expression; -(+), eine Steigerung der Matrizenmenge bedingte die Visualisierung der Expression; NID, Ductus incisivus; VNO, Vomeronasalorgan (Jacobson-Organ)

Gewebe	Tier	C57BL/6		heterozygot Tas2r114 ^{Opsin sws}		homozygot Tas2r114 ^{Opsin sws}	
		Tas2r114	sws	Tas2r114	sws	Tas2r114	sws
Blut		-	-	-	-	-	-
Herz		-	-	-	-	-	-
Lunge		-	-	-	-	-	-
Leber		-	-	-	-	-	-
Niere		-	-	-	-	-	-
Milz		-	-	-	-	-	-
Thymus		+	+	+	+	-	+
Lymphknoten		-	-	-	-	-	-
weißes Fettgewebe		-	-	-	-	-	-
braunes Fettgewebe		-	-	-	-	-	-
Hoden		+	-	+	+	-	+
Nebenhoden (Kopf)		-	-	-	-	-	-
Nebenhoden (Schwanz)		-	-	-	-	-	-
Oberschenkelmuskel		-	-	-	-	-	-
Auge		-	+	-	+	-	+
Nasenepithel		+	-	-(+)	-(+)	-	-(+)
VNO		-(+)	-	-	-	-	-(+)
anteriore Zunge		-	-	-	-	-	-

Gewebe	Tier	C57BL/6		heterozygot Tas2r114 ^{Opsin sws}		homozygot Tas2r114 ^{Opsin sws}	
		Tas2r114	sws	Tas2r114	sws	Tas2r114	sws
Blätterpapillen		+	-	+	+	-	- (+)
Wallpapille		+	-	+	+	-	+
NID		+	-	-	-	-	+
weicher Gaumen		+	-	+	+	-	+
Speiseröhre		-	-	-	-	-	-
Magen		-	-	-	-	-	-
Duodenum		-	-	-	-	-	-
Jejunum		-	-	-	-	-	-
Ileum		-	-	-	-	-	-
Dickdarm mit Caecum		-	-	-	-	-	-
Pankreas		-	-	-	-	-	-

4.4.3.2 *In-situ*-Hybridisierungen von Zungengewebe der Tas2r114^{Opsin sws}-Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren

Die Expressionsanalyse des Tas2r114-Rezeptors erforderte eine Signalamplifikation mittels TSA. Trotz dieser war der Bitterrezeptor in der Wallpapille der C57BL/6-Maus nur sehr schwach und in wenigen Geschmacksknospen pro betrachteter Papille detektierbar. Die Färbung nach Hybridisierung mit der Tas2r114-as-Sonde trat dabei vorrangig in Nähe der Geschmackspore auf und wurde nicht auf *Knockout*-Gewebeschnitten beobachtet (Abb. 4.31). Der Einsatz zweier As-Sonden für das kurzweilige Opsin führte zu keiner Signalgebung auf gustatorischem Geweben der C57BL/6-Maus. Jedoch konnte in mehreren Geschmacksknospen pro Gewebeschnitt der Wallpapille von homozygoten Tas2r114^{Opsin sws}-Tieren eine solche Zellmarkierung detektiert werden. Auch hier waren die Signale vorrangig in der Nähe der Geschmackspore zu beobachten (Abb. 4.31). Ferner wurden Gewebeschnitte von Wallpapillen der Tas2r114^{Opsin sws}- und C57BL/6-Maus mit einer gegen Gustducin gerichteten Sonde hybridisiert. Die as-Sonde führte unabhängig vom Genotyp zu starken Markierungen fast jeder Geschmacksknospe in den untersuchten Papillen. Die Verwendung von *sense*-Sonden für die Rezeptoren und das G-Protein führte zu keinen spezifischen Signalen (Abb. 4.31).

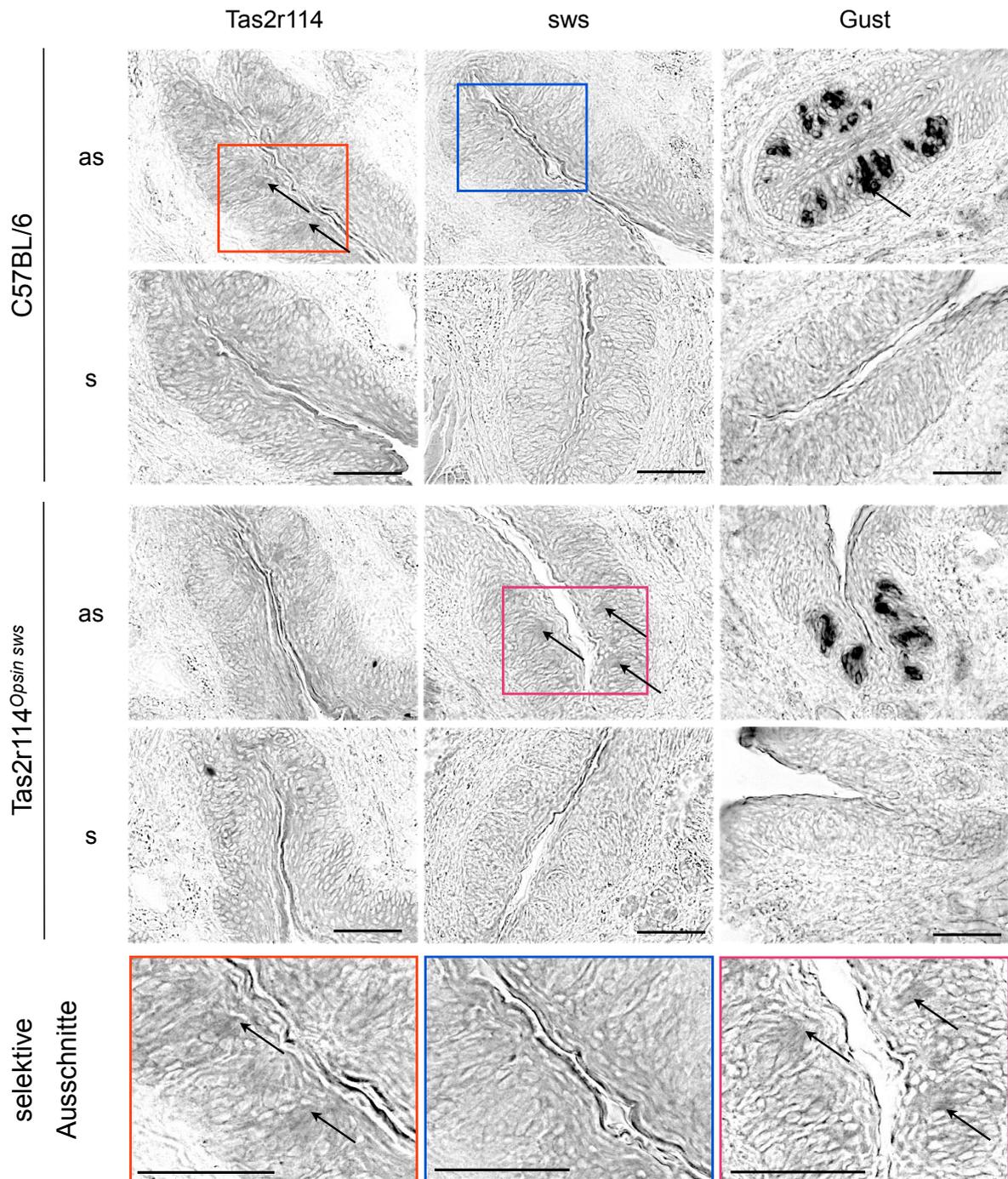


Abb. 4.31. RNA-Expressionsanalyse mittels In-situ-Hybridisierung von Wallpapillen der *Tas2r114^{Op^{sin} s^{ws}}*-Maus im Vergleich zu C57BL/6-Tieren. Für die Untersuchung der Expression von GPCRs wurden Gewebeschnitte (14 μ m) der Wallpapille von homozygoten *Tas2r114^{Op^{sin} s^{ws}}*-Tieren im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen mit Hilfe der *Tas2r114*-Sonde (mit TSA-Schritt) und *Op^{sin} s^{ws}*-Sonden (*s^{ws}*, short wavelength sensitive) hybridisiert. Die Hybridisierung der Gewebeschnitte mit der *Tas2r114*-antisense-(*as*)-Sonde führte zu Markierungen von wenigen Zellen in den Wallpapillen der C57BL/6-Maus, jedoch nicht in Gewebeschnitten eines homozygoten *Tas2r114^{Op^{sin} s^{ws}}*-Tieres. Die Hybridisierung mit der *as*-Sonde für *Op^{sin} s^{ws}* hingegen führte bei Einsatz von zwei Sonden bereits ohne Amplifikation zur Markierung von einzelnen Zellen in der Wallpapille der *Tas2r114^{Op^{sin} s^{ws}}*-Maus. Eine Anlagerung der *As*-Sonden im Gewebe der C57BL/6-Maus war nicht erkennbar. Gewebeschnitte der Wallpapille beider Mauslinien, die mit einer gegen *Gust* gerichteten Sonde hybridisiert wurden, zeigten in Anzahl und Intensität vergleichbare Markierungen von Zellen. Gewebeschnitte, die mit den *sense*-(*s*)-Sonden hybridisiert wurden, blieben ohne detektierbare Markierung. Pfeile zeigen exemplarisch auf mRNA-Markierungen in den Geschmacksknospen der Pilzpapille. Maßstab: 35 μ m.

4.4.3.3 Immunhistochemische Untersuchungen von Geschmackspapillen homozygoter Tas2r114^{Opsin sws}-Nachkommen

Der immunhistochemische Nachweis des kurzwelligen Opsins in der Mundhöhle des homozygoten Tas2r114^{Opsin sws}-Mausmodells erfolgte unter Einsatz eines mit TSA amplifizierten Färbeprotokolls auf 14- μ m-Kryoschnitten (Abb. 4.32). Gewebeschnitte der Blätter- und Wallpapille zeigten stets zelluläre Markierungen nach Antikörperinkubation und Anregung am konfokalen *Laserscan*-Mikroskop mit Licht von 488 nm. Opsin-sws-positive Zellen im NID konnten ebenfalls in fast jeder betrachteten Geschmacksknospe nachgewiesen werden. Schwieriger war der Nachweis in Knospen des weichen Gaumens und der Pilzpapillen. Während für den weichen Gaumen generell nur wenige Geschmacksknospen betrachtet wurden, erfolgte für die Pilzpapillen eine Untersuchung von 329 Papillen von vier Zungenspitzen homozygoter Tas2r114^{Opsin sws}-Tiere beider Geschlechter. Von ihnen konnten 27 als Opsin-sws-positiv eingestuft werden. Dies entsprach einem Anteil von 8 %.

Ein Vergleich der Opsin-sws-Expression auf Proteinebene mit der mRNA-Expression von Tas2r114 (ebenfalls mit TSA-Amplifikation nachgewiesen; vgl. Abb. 4.31) und Opsin sws (Nachweis ohne TSA-Amplifikation; vgl. Abb. 4.31) zeigte, dass das Opsin-Protein häufiger und eindeutiger nachgewiesen werden konnte, als die entsprechenden mRNAs. Allerdings wurde auch hier ersichtlich, dass der Rezeptor zumeist in unmittelbarer Nähe zur Geschmackspore lokalisiert und nur in vereinzelten Geschmacksknospen pro Gewebeschnitt nachweisbar war.

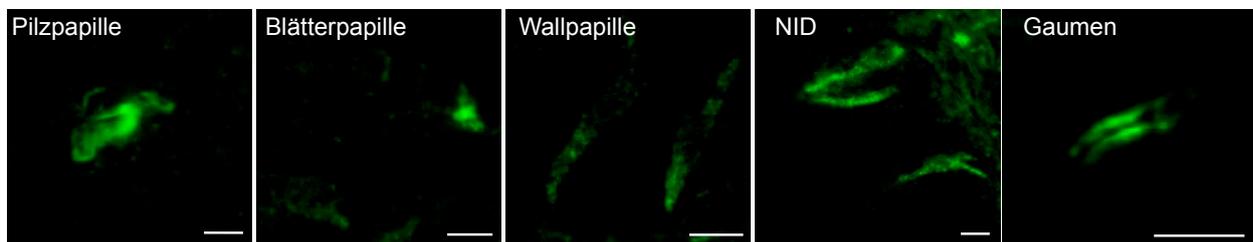


Abb. 4.32. Opsin-sws-(Tas2r114)-exprimierende Zellen in den Geschmacksknospen der Mundhöhle der Tas2r114^{Opsin sws}-Maus. Dargestellt sind grün fluoreszierende Zellen eines Fluoreszenzgekoppelten immunhistochemischen Opsin sws-(short wavelength sensitive)-Nachweises nach Laseranregung bei 488 nm mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie. Opsin-sws-positive Zellen (grün) waren in Gewebeschnitten (14 μ m) von Pilz-, Blätter- und Wallpapillen sowie Geschmacksknospen des weichen Gaumens und der Papilla incisiva (NID) homozygoter Tas2r114^{Opsin sws}-Tiere nachweisbar. Maßstab: 10 μ m.

Um die Opsin-sws-Expression einem Zelltyp zuzuordnen zu können, wurden Kofärbungen von Opsin sws mit NTPDase 2, PLC β 2 und AADC vorgenommen. Hierfür wurden Wallpapillen von homozygoten Tas2r114^{Opsin sws}-Tieren und C57BL/6-Mäusen betrachtet. Bedingt durch die häufige Detektion der Opsin-sws-Fluoreszenz in unmittelbarer Nähe zur Geschmackspore war eine genaue Zuordnung zu verschiedenen Zelltypmarkern in zahlreichen Gewebeschnitten nur bedingt möglich. Bei Opsin-sws-anzeigenden Fluoreszenzen, die größere Teile einer Zellstruktur ausfüllten, jedoch wurde deutlich, dass nur PLC β 2-positive Zellen eine teilweise Überlappung mit Opsin-sws-positiven Zellen aufwiesen. Eine derartige Kolo-kalisation für NTPDase 2- oder AADC-positive Zellen wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet (Abb. 4.33).

Folglich stellen die Opsin-sws-positiven Zellen (Tas2r114-exprimierende Zellen) eine Unterpopulation der PLC β 2-positiven Zellen dar.

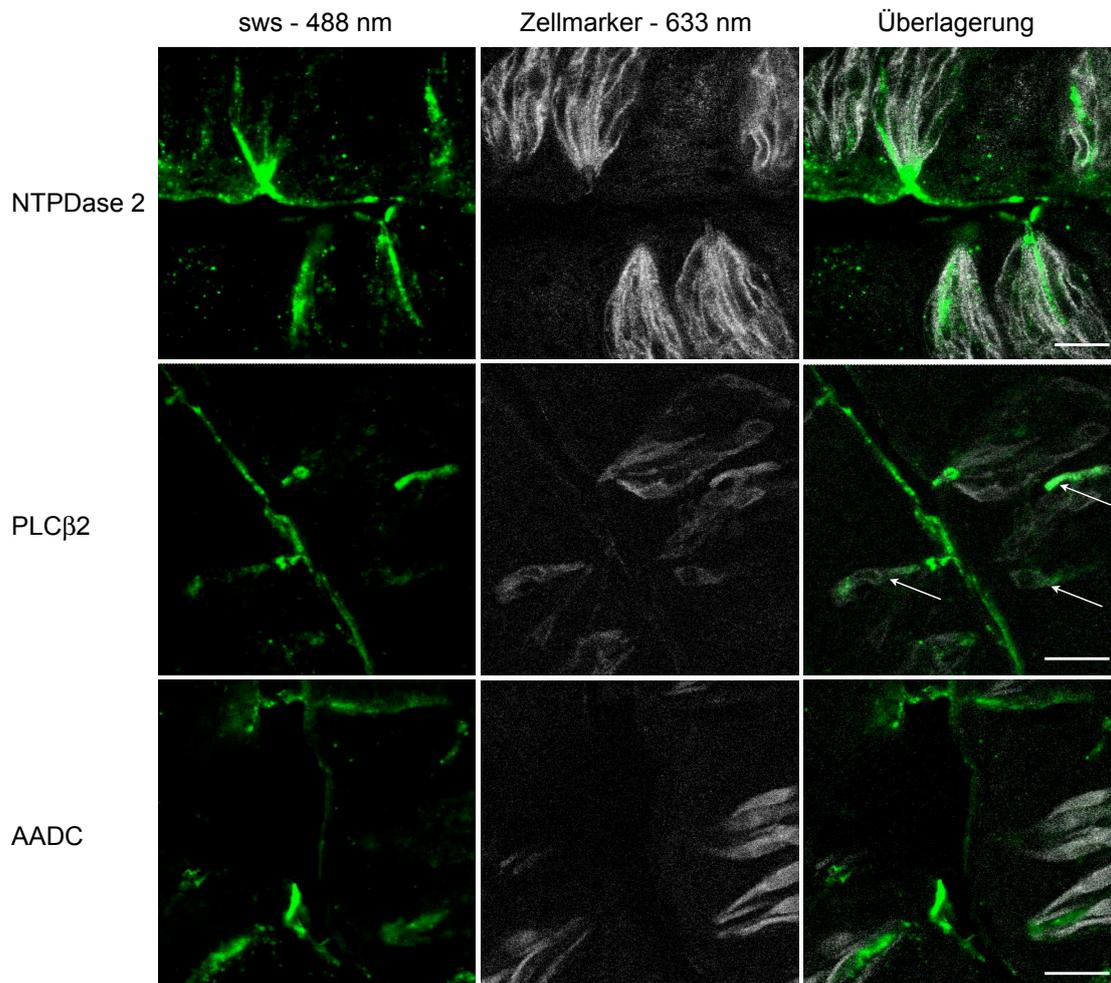


Abb. 4.33. Immunhistochemische Analysen zur Koexpression von Opsin-sws-positiven Zellen mit Zelltypmarkern der Geschmacksknospe in Wallpapillen der *Tas2r114*^{Opsin sws}-Maus. Fluoreszenzaufnahmen einer Ebene von Kryoschnitten (14 μ m) nach Antikörperfärbung für nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase 2, weiß), Phospholipase C β 2 (PLC, weiß) und L-aromatic acid decarboxylase (AADC, weiß) und Opsin short wavelength sensitive (sws, grün). Eine zeitgleiche Anregung mit Licht der Wellenlänge 633 nm (für Zelltypmarker) und 488 nm (für Opsin sws) belegte, dass die Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper, die gegen die Spezies der Antikörper für NTPDase 2 und AADC gerichtet waren, zu keiner Kolokalisation mit der bei 488 nm anregbaren Fluoreszenz des Opsin sws führten. Einzig die Färbung mit dem gegen PLC gerichteten Antikörper bedingte eine Kolokalisation beider im Laserscan-Mikroskop detektierten Fluoreszenzen (Pfeil). Maßstab: 20 μ m.

5 Diskussion

5.1 Funktionelle Charakterisierung von Bitterrezeptoren der Maus im Vergleich zu humanen Geschmacksrezeptoren

Die Maus (*Mus musculus*) ist in der Geschmacksforschung ein sehr häufig eingesetztes Versuchsmodell. Schnelle Geschlechtsreife und kurze Zuchtzeiten, ein geringer Platzbedarf und leichtes *Handling* machen die Maus zu einem praktikablen Versuchstier. Des Weiteren kann die genetische Variabilität durch Inzuchtverpaarungen gering gehalten werden (Hedrich & Bullock, 2004). Die Möglichkeit der genetischen Manipulation des seit 2002 entschlüsselten Genoms bedingten eine weitere Steigerung des Einsatzes der Maus als Versuchstier (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz, www.bmelv.de).

Da die Maus – wie der Mensch – zu den Säugetieren gehört, wird eine bedingte Übertragbarkeit der am Mausmodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen und umgekehrt angenommen. So auch in der Wahrnehmung von Bitterstoffen. Hier lag der Fokus der Deorphanisierung im letzten Jahrzehnt auf den Bitterrezeptoren des Menschen, von denen 20 mindestens ein Ligand zugewiesen werden konnte (Chandrashekar *et al.*, 2000; Bufe *et al.*, 2002, 2005; Kim *et al.*, 2003; Behrens *et al.*, 2004, 2009; Kuhn *et al.*, 2004; Pronin *et al.*, 2004, 2007; Sainz *et al.*, 2007; Dotson *et al.*, 2008; Maehashi *et al.*, 2008; Intelmann *et al.*, 2009; Meyerhof *et al.*, 2010; Narukawa *et al.*, 2011). Demgegenüber waren zu Beginn dieser Arbeit nur zwei der 35 Tas2rs der Maus hinsichtlich ihrer Agonisten untersucht und in der Literatur beschrieben. Jedoch galt zu diesem Zeitpunkt die allgemeine Annahme, dass Bitterrezeptoren der Maus durch die gleichen Bitterstoffe wie ihre humanen, orthologen TAS2Rs aktiviert werden (Chandrashekar *et al.*, 2000).

Die wenigen bekannten Liganden für die Bitterrezeptoren Tas2r105 und Tas2r108 aus der Publikation von Chandrashekar *et al.* (2000) und die Identifizierung von Cucurbitacin E als Liganden des Bitterrezeptors Tas2r114 2007 durch Dr. Peng Shi (zu jenem Zeitpunkt Mitarbeiter der Abteilung Molekulare Genetik am DIfE; unveröffentlicht) schienen die Annahme zu bestätigen, dass orthologe Rezeptoren von Mensch und Maus durch das gleiche Ligandenspektrum aktiviert werden. Genaue Analysen zu dieser Hypothese fehlten jedoch. Um diese Aussage zu überprüfen und um eine bessere Grundlage für Verhaltensexperimente mit dem Organismus *Mus musculus* und Bitterstoffen zu erzielen, wurde eine ausführliche Untersuchung des Agonistenspektrums von 16 Bitterrezeptoren der Maus vorgenommen. Hierfür wurden HEK293T-G α 16gust44-Zellen mit Rezeptorplasmiden transient transfiziert und in *Calcium-Imaging*-Experimenten auf ihre Aktivierbarkeit durch chemisch divergente Bittersubstanzen analysiert.

Im Zuge dieser Untersuchungen gelang es für acht der 16 betrachteten Bitterrezeptoren Liganden zu identifizieren (vgl. Tab. 4.1), unter ihnen fünf Rezeptoren, die bis dato als *orphan* galten. Allen Rezeptoren war die Aktivierung durch Bitterstoffe gemein. Die acht deorphanen Bitterrezeptoren der Maus konnten insgesamt durch 41 % der getesteten Bitterstoffe aktiviert werden. Diese Tas2rs umfassten Sensoren für Terpenoide, Alkaloide, Flavonoide und Glycoside, die häufig im Pflanzenreich vertreten sind. Rezeptoren wie Tas2r105, Tas2r114 und

Tas2r119 scheinen dabei vorrangig an der Vermittlung des Bittergeschmacks von Terpenoiden beteiligt zu sein, während unter den Liganden von Tas2r108, Tas2r140 und Tas2r144 häufig Alkaloide zu finden waren (Substanzklasseneinteilung siehe Anhang).

Insbesondere Tas2r105 und Tas2r144 zeichneten sich mit der Erkennung von zusammen 39 der 114 (34 %) getesteten Bitterstoffe durch ein sehr breites Agonistenspektrum aus (vgl. Abb. 4.4).

Tas2r105-transfizierte Zellen konnten dabei nicht nur allein durch 25 % der getesteten Substanzen aktiviert werden, sondern bewirkten mit Ausnahme von Yohimbin auch eine tendenziell stärkere Ca^{2+} -Ausschüttung bei identischen Liganden im Vergleich zu Tas2r144-transfizierten Zellen. Dementsprechend scheint Tas2r105 unter den 16 betrachteten Bitterrezeptoren eine gewichtige Funktion in Wahrnehmung von Bitterstoffen bei der Maus einzunehmen.

Die Beobachtung eines großen Ligandenspektrums für Tas2r105 stand dabei im klaren Widerspruch zu Publikationen von Chandrashekar *et al.* (2000) und Sainz *et al.* (2007). Erstere testeten 55 Substanzen inklusive Zucker, Süßungsmittel, Aminosäuren und 24 Bitterstoffe, auf die Aktivierung von Tas2r105. Hierbei wurde einzig für Cycloheximid eine Aktivierung des Rezeptors beschrieben. Von den von Chandrashekar getesteten 24 Bitterstoffen kamen 19 auch im Zuge unserer Experimente zum Einsatz. Die hier eingesetzten Konzentrationen lagen mit Ausnahme von der für Salicin deutlich unter den von Chandrashekar verwendeten. Dennoch konnten wir neben Cycloheximid aus jener Auswahl weiterhin eine Aktivierung des Rezeptors durch Denatoniumbenzoat, PROP, Chinin und Yohimbin feststellen (vgl. Tab. 4.2. und Abb. 4.4).

Der Geschmacksstoff Cycloheximid wird von Mäusen als extrem bitter wahrgenommen (Chandrashekar *et al.*, 2000; Kusano *et al.*, 1971; Lush & Holland, 1988). Bereits Konzentrationen von $\sim 0,25 \mu\text{M}$ bzw. $2 \mu\text{M}$ können von Schmecker-Stämmen bzw. Nicht-Schmecker-Stämmen wahrgenommen werden (Kusano *et al.*, 1971; Lush & Holland, 1988). Chandrashekar beschrieb für den von ihm angewandten, zellbasierten Assay für Tas2r105 einen EC_{50} -Wert von $0,5 \mu\text{M}$ und eine Detektionsgrenze von $\sim 0,2 \mu\text{M}$. Im Zuge unserer Experimente konnte ein vergleichbarer EC_{50} -Wert von $0,25 \pm 0,23 \mu\text{M}$ und eine Detektionsgrenze von $0,01 \mu\text{M}$ erfasst werden. Die Detektion der Aktivierung von Tas2r105-transfizierten Zellen bei deutlich niedrigeren Konzentrationen als in der Publikation von Chandrashekar beschrieben, bekräftigt die höhere Sensitivität des hier verwendeten Verfahrens.

Nach gegenwärtiger Datenlage führt Cycloheximid einzig zur Aktivierung des Bitterrezeptors Tas2r105. Der *Knockout* dieses Rezeptors sollte folglich zum Verlust der Wahrnehmung dieses Carbonsäureimids führen. Eine Tas2r105-*Knockout*-Maus, die 2005 von Mueller und Kollegen/innen publiziert wurde, zeigte in der Tat einen fast vollständigen Verlust der Cycloheximiddetektion. Einzig Gaben im mM-Bereich führten zu aversivem Verhalten. Die Wahrnehmung solch hoher Konzentrationen Cycloheximids könnte einerseits durch eine Tas2r-vermittelte Rezeption eines Rezeptors, der ein im mM-Bereich gelegenes Aktivierungsspektrum aufweist, durch postingestive Effekte oder durch direkte intrazelluläre Beeinflussung bedingt

sein (siehe unten). Lickometerexperimente belegten, dass der *Knockout* von Tas2r105 keine Unterschiede in der Rezeption zahlreicher Bitterstoffe im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nach sich zog (Mueller *et al.*, 2005).

Auch in unserem HEK293T-basierten Assay konnte für eine Vielzahl dieser getesteten Stoffe, unter ihnen die Substanzen Atropin, Brucin, Chloroquin, Colchicin, Papaverin, Spartein, Strychnin und Theophyllin, keine Aktivierung des Bitterrezeptors Tas2r105 beobachtet werden (Tab. 4.1 und Abb. 4.4). Abweichend hiervon wurden Chinin, Denatonium und PROP in den von uns durchgeführten *Calcium-Imaging*-Experimenten als Agonisten von Tas2r105 identifiziert, während die Tas2r105-*Knockout*-Tiere eine Ablehnung im nahezu identischen Konzentrationsbereich wie die Wildtyp-Tiere zeigten. Dass der Verlust von Tas2r105 keine veränderte Wahrnehmung der drei Bittersubstanzen zur Folge hatte, könnte kompensatorisch wirkenden Bitterrezeptoren geschuldet sein. So führen Denatonium und PROP unter den bisher analysierten Tas2rs zur Aktivierung zweier weiterer Rezeptoren, während Chinin über drei zusätzliche Rezeptoren wahrgenommen werden kann. Auch nicht rezeptorvermittelte Signalwege wären eine mögliche Erklärung für den von Mueller beobachteten Phänotyp. So können Geschmackseindrücke von Bitterstoffen auch Rezeptor-unabhängigen Signalwegen geschuldet sein. 1994 beschrieben Naim *et al.* die direkte Aktivierung von G-Proteinen wie Transducin und G_i/G_o-Proteine durch amphiphile Süß- und Bitterstoffe, bspw. Chinin. Weiterhin wurde für Chinin eine inhibitorische Wirkung auf K⁺-Kanäle und Einflüsse auf den zellulären Ionentransport durch Blockierung der Na⁺/K⁺-ATPase, des Na⁺/K⁺/2Cl⁻-Kotransporters und des Na⁺/H⁺-Austauschers berichtet (Smith & Levison, 1989). Aber auch inhibitorische Effekte auf K⁺-Kanäle sowie die Blockierung von Na⁺-Transportern und Na⁺-Kanälen wurden für verschiedene Geschmacksstoffe beschrieben (Spielman *et al.*, 1992; Lindemann, 1996).

Auch hinsichtlich des von mir ermittelten Ligandenspektrums des Bitterrezeptors Tas2r108 wurden Abweichungen zu publizierten Daten festgestellt (vgl. Tab. 4.1. und Abb. 4.3). Während Chandrashekar und Kollegen/innen eine Aktivierung durch Denatoniumbenzoat und hohe Konzentrationen von PROP berichteten, konnte mit unserem Nachweissystem nur die Aktivierung des Rezeptors mit PROP belegt werden. Weiterhin konnten aus der Auswahl, der von Chandrashekar getesteten Substanzen, ebenfalls Chinin und Yohimbin als Liganden von Tas2r108 identifiziert werden.

Hierbei ist anzumerken, dass beide Arbeitsgruppen voneinander abweichenden Messsysteme nutzten. Während Chandrashekar Einzelzell-*Calcium-Imaging*-Experimente durchführte, wurden in unserem Fall Zellantworten von einer Vielzahl an Zellen im 96-Loch-Format im FLIPR erfasst. Auch variierten die Messsysteme hinsichtlich des verwendeten G-Proteins. So nutzte Chandrashekar HEK-Zellen, die das G-Protein G α 15 exprimierten, während die von uns genutzten Zellen die G-Protein-Chimäre G α 16gust44 exprimierten.

Eine von mir durchgeführte Kotransfektion des Rezeptors Tas2r108 mit G α 15 bestätigte die Beobachtungen von Chandrashekar, dass die von ihm beschriebene Aktivierung G α 15-abhängig ist und dass Denatoniumbenzoat bei Anwesenheit dieses G-Proteins Tas2r108 aktiviert.

Folglich könnten auch die zuvor erwähnten Unterschiede, die für die Aktivierung von Tas2r105 und Tas2r108 beobachtet wurden, auf eine andere Kopplungseffizienz des G-Proteins G α 15 im Vergleich zur hier verwendeten G-Protein-Chimäre G α 16gust44 mit dem Rezeptor zurückzuführen sein. In *In-vitro*-Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass das verwendete G-Protein einen Einfluss auf das Ligandenspektrum und die Pharmakologie eines Rezeptors haben kann (Kostenis *et al.*, 2005; Shirokova *et al.*, 2005). Funktionelle Analysen von Rezeptoren sollten daher unter der nativen Zellsituation möglichst nahe kommenden Konditionen erfolgen (Kenakin, 2002).

Eine andere Möglichkeit für die beobachteten Sensitivitätsunterschiede könnte eine variierende Effizienz des Transportes der Rezeptorproteine zur Plasmamembran in HEK293T-Zellen sein. Zahlreiche Studien zeigen, dass GPCRs *Chaperone* benötigen, um ihre Prozessierung und Zielsteuerung zu gewährleisten (Baker *et al.*, 1994; Dwyer *et al.*, 1998; Krautwurst *et al.*, 1998). Um die Effizienz des Transportes zur Plasmamembran zu erhöhen, wurden von der Arbeitsgruppe um Charles Zuker *Rho-Tags* eingesetzt, die die ersten 39 Aminosäuren des bovinen Rho kodierten, während hier ein Zielsteuerungsmotiv aus den 45 N-terminalen Aminosäuren des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 der Ratte verwendet wurde.

Basierend auf der oben erwähnten Identifizierung der ersten Liganden für zwei Bitterrezeptoren der Maus postulierte Chandrashekar, dass murine Bitterrezeptoren durch die gleichen Liganden wie ihre humanen Verwandten aktiviert werden (Chandrashekar *et al.*, 2000).

Ein Vergleich der identifizierten Liganden der acht orphanen Bitterrezeptoren der Maus mit den bekannten Aktivatoren der humanen TAS2Rs offenbarte jedoch, dass nur in 10 % der Fälle eine Aktivierung der Bitterrezeptoren beider Spezies durch denselben Bitterstoff auftrat (vgl. Tab. 4.2).

Im Zuge dieser Analysen wurden unter anderem auch fünf Eins-zu-eins-Orthologe-Beziehungen betrachtet, unter ihnen die murinen Bitterrezeptoren Tas2r108, Tas2r119, Tas2r131, Tas2r138 und Tas2r144. Bei Untersuchung der Aktivierung dieser Rezeptoren und ihrer humanen Verwandten konnte, mit Ausnahme des weiterhin orphanen Rezeptors Tas2r131, nur eine Deckungsgleichheit zwischen 9 % und 20 % beobachtet werden.

Die statistische Überprüfung, ob die Aktivierung von Bitterrezeptoren der Maus abhängig von der Aktivierung der humanen Rezeptoren erfolgte, wurde mittels Chi-Quadrat-Vierfeldertest verifiziert. Der Chi-Quadrat-Vierfeldertest erlaubt die Prüfung, ob zwei dichotome Merkmale (Aktivierung und keine Aktivierung eines Rezeptors) stochastisch unabhängig sind oder ob die Verteilung dieses Merkmals in zwei Gruppen (orthologe Rezeptoren von Maus und Mensch) identisch ist. Bei der Annahme einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ ergibt sich ein kritischer Entscheidungswert für Chi-Quadrat von 3,841. Da die erhaltenen Prüfwerte für alle aktivierbaren Bitterrezeptoren der Maus im Vergleich zu ihren orthologen, humanen Rezeptoren größer waren, als der kritische Wert zum gewählten Signifikanzniveau, besteht zwischen der Aktivierung der Bitterrezeptoren beider Spezies ein signifikanter Unterschied. Folglich tritt die beobachtete Aktivierung von Bitterrezeptoren der Maus unabhängig von der Aktivierung der

humanen Bitterrezeptoren auf. Die Aussage, dass Mausrezeptoren durch dieselben Bitterstoffe wie ihre humanen, orthologen Rezeptoren aktiviert werden, ist daher nicht haltbar.

Bspw. werden PROP und PTC nach heutiger Datenlage beim Menschen ausschließlich über TAS2R38 erkannt (Meyerhof *et al.*, 2010). Für den Eins-zu-eins-orthologen Mausrezeptor Tas2r138 konnte jedoch für keine der beiden Substanzen eine Aktivierung aufgezeigt werden (vgl. Abb. 4.5). PROP führte allerdings zur Aktivierung von Tas2r105, Tas2r108 und Tas2r120 (vgl. Tab. 4.1). Demgegenüber war 5-Propyl-2-thiouracil, das nur durch die Stellung der Propylgruppe von PROP abweicht, in der Lage, eine Ca²⁺-Ausschüttung durch Interaktion mit Tas2r138 im *Zellassay* herbeizuführen. Eine Aktivierung der murinen Rezeptoren, die mit PROP interagierten, wurde allerdings für diese Substanz nicht beobachtet (vgl. Tab. 4.1).

Ein anderes Beispiel ist Amarogentin. Amarogentin aktiviert die humanen Rezeptoren TAS2R1, TAS2R4, TAS2R39, TAS2R43, TAS2R46, TAS2R30 und TAS2R50. Bei der Maus konnte die Aktivierung von Tas2r105, Tas2r108 und Tas2r140 durch das Terpenoid nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4.1). Folglich wird der Bitterstoff von beiden Spezies detektiert, jedoch erfolgt die Vermittlung des Bittergeschmacks, mit Ausnahme der Orthologen TAS2R4 und Tas2r108, jeweils über nicht-orthologe Rezeptoren. So werden beim Menschen vier Rezeptoren aus dem humanen Cluster durch Amarogentin aktiviert, jedoch führte die Substanz weder bei Tas2r120 noch bei Tas2r136 – den homologen Mausrezeptoren – zu einer Stimulation. Umgekehrt wird die Bitterkeit von Amarogentin bei der Maus nach heutigem Kenntnisstand vorrangig über Tas2r105 vermittelt. Dessen einziger humaner Orthologe TAS2R10 zeigte jedoch keine Aktivierung durch diesen Bitterstoff (vgl. Abb. 4.3).

Auch das Alkaloid Noscapin führte zur Aktivierung von humanen und murinen Bitterrezeptoren. Während im Menschen Noscapin einzig zur Aktivierung von TAS2R14 führte, konnte bisher das Alkaloid als Agonist für Tas2r108 in der Maus identifiziert werden. Eine orthologe Beziehung zwischen jenen Rezeptoren besteht nicht. Gleiches gilt für die Schwefelverbindung PEITC, die TAS2R38 und Tas2r105 aktiviert.

Phenyl-β-D-Glucose und strukturell verwandte Glycoside wie Salicin, Helicin und Arbutin, die beim Menschen zur Aktivierung von TAS2R16 führen, aktivierten – in Übereinstimmung mit den experimentellen Daten von Mueller *et al.* (2005) – keinen der 16 analysierten Bitterrezeptoren.

Weiterhin wurde postuliert, dass Cluster, die aus Duplikationen einzelner Rezeptoren in einer Spezies während der Evolution hervorgegangen sind, das gleiche Ligandenspektrum abdecken wie der singuläre, orthologe Rezeptor einer anderen Spezies (Meyerhof *et al.*, 2010). Auch diese Hypothese kann entsprechend der hier vorliegenden Daten nicht bestätigt werden.

Die Betrachtungen des humanen und der murinen Cluster offenbarten die größten Abweichungen zwischen den Spezies. Die Prüfung der Aktivierbarkeit der zwei Mausrezeptoren Tas2r120 und Tas2r136, die acht humanen Rezeptoren ortholog sind, zeigte nur eine übereinstimmende Aktivierung durch zwei Substanzen für Tas2r120 und keine Aktivierbarkeit von Tas2r136, während durchschnittlich 46 Substanzen nur das humane Cluster aktivierten. Die Annahme, dass Tas2r120 und Tas2r136 das Ligandenspektrum des humanen Clusters abdecken, ist folglich nicht haltbar.

Die analysierten Bitterrezeptoren der Mauscluster eins und zwei wurden demgegenüber nur in 19 % bis 39 % bzw. 0 % bis 8 % der Fälle durch die gleichen Bitterstoffe wie die humanen, orthologen TAS2R10 bzw. TAS2R14 aktiviert.

Tas2r114 ist höchstwahrscheinlich der direkte Vorfahr, aus dem sich das Cluster eins in der Maus durch Duplikation entwickelt hat (Conte *et al.*, 2003). Dabei war auffällig, dass Tas2r114 der einzige Rezeptor war, dessen Agonisten alle den humanen, orthologen Rezeptor TAS2R10 aktivierten. Jedoch aktivierten 25 % der analysierten Substanzen TAS2R10, jedoch nicht den Mausrezeptor Tas2r114. Für das Mauscluster um TAS2R14 konnte eine solche Deckungsgleichheit nicht geprüft werden, da der unmittelbare Orthologe Tas2r125 nicht in der vorliegenden Untersuchung betrachtet wurde. Des Weiteren konnten nur für einen der vier aus diesem Cluster betrachteten Mausrezeptoren überhaupt Liganden identifiziert werden. Von den sechs aufgedeckten Aktivatoren konnte jedoch nur bei drei von ihnen auch eine Aktivierung von TAS2R14 beobachtet werden.

Es kann somit festgehalten werden, dass die aus jenen Clustern aktivierten Rezeptoren der Maus nach heutigem Kenntnisstand spezifischer als ihre direkten humanen Verwandten agieren.

Darüber hinaus wird aus diesen Analysen ersichtlich, dass Bitterrezeptoren der Maus zumeist durch deutlich weniger Bitterstoffe aktiviert werden als die humanen. Im Durchschnitt aktivierten 20 der 114 betrachteten Substanzen einen humanen Rezeptor, während für die orphanen Mausrezeptoren durchschnittlich nur 10 Liganden identifiziert wurden. Auch führten 37 Substanzen ausschließlich zur Aktivierung der humanen Rezeptoren, jedoch zu keiner Aktivierung von einem der 16 untersuchten murinen Bitterrezeptoren.

Die variierende Sensitivitäten der Bitterrezeptoren der Spezies spiegeln sich auch in der unterschiedlichen Wahrnehmung einiger Bitterstoffe wider. So lehnen bspw. Mäuse Chloramphenicolösungen von 1 mM nicht ab, während diese für den Menschen bereits extrem bitter sind (Lush, 1991). Auch Denatoniumbenzoat wird von Mäusen nur so bitter wie Chinin empfunden, während Denatonium nach heutigem Kenntnisstand für den Menschen die bitterste synthetische Verbindung ist (Lush, 1991). Auch liegen Unterschiede in der Wahrnehmung von PTC und PROP zwischen beiden Spezies vor. Während die Bitterkeit dieser beiden Verbindungen beim Menschen an den Genotyp des Bitterrezeptors TAS2R38 gebunden ist, erfolgt bei der Maus die Vermittlung beider Substanzen unabhängig voneinander, was die Aktivierung von unterschiedlichen Rezeptoren durch jene Bitterstoffe vermuten lässt (Guo & Reed, 2001; Nelson *et al.*, 2003).

Diese Unterschiede könnten auf eine geringere Konservierung der Sequenz der Bitterrezeptorproteine bei Mensch und Maus zurückzuführen sein (Conte *et al.*, 2003). Folglich scheint es mehr Rezeptoren in der Maus zu bedürfen, um die Diversität an Bitterstoffen in der Natur wahrzunehmen und die Aufnahme von potentiell toxischen Stoffen zu unterbinden bzw. zu reduzieren. Dies korreliert mit der Sachverhalt, dass die Maus ein etwa 40 % größeres Rezeptorrepertoire besitzt als der Mensch.

Die Variation der TAS2-Rezeptoren zwischen den Spezies könnte die Anpassung an individuelle Lebensräume, basierend auf Genduplikationen und Bildung von Pseudogenen, widerspiegeln (Behrens *et al.*, 2004). Die Wahl der Nahrung und die Veränderungen in der Nahrungszubereitung könnten hierbei direkten Einfluss auf die Evolution der Tas2r-Proteine genommen haben (Harris, 1992; Leonard, 2002; Milton, 2003). Für den Menschen dürfte insbesondere die Nutzung des Feuers vor 800.000 Jahren (Goren-Inbar *et al.*, 2004) und der damit verbundene reduzierte Konsum pflanzlicher Lebensmittel, einhergehend mit einem gesteigerten Verzehr von Fleisch, die Reduktion der TAS2Rs bedingt haben, da tierisches Gewebe weniger bittere und toxische Komponenten enthält als pflanzliches (Glendinning, 1994).

Dass am Ende von den 16 untersuchten Bitterrezeptoren acht *orphan* blieben, ist daher sehr wahrscheinlich auf das enge Aktivierungsspektrum der murinen Bitterrezeptoren zurückzuführen. Auch wäre denkbar, dass sich die Bindung bzw. die Kopplungseffizienz dieser Rezeptoren an das G-Protein von den deorphanisierten Tas2rs unterscheidet.

Eine andere Erklärung für die nicht gelungene Deorphanisierung der Rezeptoren Tas2r102, Tas2r103, Tas2r109, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r131, Tas2r136 und Tas2r143 könnten Variationen in der Expression der Rezeptoren in HEK293T-Zellen sein. Für Tas2r103, Tas2r131 und Tas2r136 kann dieser Punkt nicht unberücksichtigt gelassen werden, da nur vereinzelte, mit diesen Plasmiden transfizierte Zellen, eine HSV-Expression aufzeigten (vgl. Abb. 4.1). Für andere weiterhin orphanen Rezeptoren, insbesondere Tas2r115, Tas2r118 und Tas2r143 gilt dieses Argument nicht. Auch konnte mit den Rezeptorplasmiden Tas2r105 und Tas2r114 gezeigt werden, dass auch bei gering exprimierten Rezeptoren Aktivierungen durch spezifische Bitterstoffe erfasst werden können (vgl. Tab. 4.1). Demzufolge wird eine direkte Beziehung zwischen Expression und Aktivierbarkeit für unwahrscheinlich gehalten.

Des Weiteren könnte diese Beobachtung auf verschiedene Genvarianten der Tas2rs innerhalb der Spezies zurückzuführen sein. So ist für die Maus seit mehr als 40 Jahren beschrieben, dass verschiedene Inzuchtstämme Bitterstoffe mit unterschiedlicher Sensitivität wahrnehmen. Zu diesen Bitterstoffen zählen bspw. Sucroseoctaacetat (SOA; Warren & Lewis, 1970; Whitney & Harder, 1986, 1994; Boughter Jr. & Whitney, 1997; Capeless *et al.*, 1992), Raffinoseundecaacetat, Cycloheximid, Kupferglycinat und Chinin (Lush, 1984, 1986; Lush & Holland, 1988). Die Analyse einer Nicht-Schmecker-Rezeptorvariante würde daher eine mögliche Erklärung für die ausgebliebene Aktivierung oder die Notwendigkeit des Einsatzes höherer Konzentrationen, die nicht mit dem Messsystem vereinbar sind, darstellen. Der hohe Anteil an orphanen Rezeptoren macht diese Vermutung jedoch ebenfalls nicht sehr wahrscheinlich.

Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass sich unter den 114 getesteten Substanzen nicht-identifizierte Liganden für die 16 betrachteten Bitterrezeptoren der Maus befanden, da den verwendeten Konzentrationen an Bitterstoffen hinsichtlich der Löslichkeit und Toxizität für die Zellen Grenzen gesetzt waren. Ob eine Aktivierung durch solch hochkonzentrierte Bitterlösungen jedoch physiologisch relevant ist und die natürlichen Gegebenheiten widerspiegelt, wird bezweifelt.

Für die Identifizierung weiterer Liganden und Deorphanisierung weiterer Rezeptoren wird es daher weitere Untersuchungen mit anderen Bittersubstanzen bedürften.

Neben Unterschieden im Agonistenspektrum zeigten die Experimente weiterhin, dass Bitterrezeptoren der Maus in der Breite ihres Ligandenspektrums variierten. Während einzelne Rezeptoren nur durch einige wenige Bitterstoffe aktiviert wurden, reagierten andere auf zahlreiche Bitterstoffe. Eine solche Variation des Ligandenspektrums wurde zuvor auch für die humanen Bitterrezeptoren beschrieben (Meyerhof *et al.*, 2010). Dabei ergaben sich nicht nur Unterschiede hinsichtlich der Anzahl der Liganden einzelner Rezeptoren, auch führten einzelne Bitterstoffe zur Aktivierung mehrerer Rezeptoren. So stimulierten 25 % der Bitterstoffe zwei Rezeptoren, sechs Substanzen drei Rezeptoren und zwei natürliche Bitterstoffe (Chinin und Yohimbin) vier der betrachteten Bitterrezeptoren der Maus (vgl. Tab. 4.1).

Für Chinin wurde bereits in den 90er Jahren eine solche Mehrfachaktivierung von Bitterrezeptoren postuliert. Schon früh wurde beschrieben, dass Chinin von Mausstämmen unterschiedlich intensiv wahrgenommen wird. (Lush, 1984; Bachmanov *et al.*, 1996; Nelson *et al.*, 2005). Diese Sensitivitätsunterschiede sollten polygenetische Variationen geschuldet sein (Boughter Jr. *et al.*, 1992). Clusteranalysen von DBA/2J- und C57BL/6-Tieren, die Chinin unterschiedlich intensiv schmecken, zeigten, dass *Tas*-Gene zwischen den Markergenen D6Mit61 und D6Mit374 auf Chromosom sechs für diese Unterschiede in der Chinindetektion verantwortlich sein könnten (Nelson *et al.*, 2005). Innerhalb dieses Genabschnitts liegen die zwei Bitterrezeptoren *Tas2r105* und *Tas2r140*, die von uns in *Calcium-Imaging*-Experimenten positiv auf die Aktivierung durch Chinin getestet wurden. Beiden Rezeptoren ist gemein, dass sie im DBA-Mausstamm *missense*-Mutationen aufweisen, die die Wahrnehmung des Bitterstoffes beeinflussen könnten. Die Gene *Tas2r108* und *Tas2r144*, deren Proteine ebenfalls durch Chinin aktiviert wurden, liegen hingegen weit ausserhalb dieser Region auf Chromosom sechs. Ein Indiz, dass *Tas2r105* und *Tas2r140* daher vorrangig an der Vermittlung des Bitterstoffes beteiligt sind, war jedoch nicht erkennbar, da für alle identifizierten Rezeptoren eine vergleichbare Ca^{2+} -Ausschüttung erfasst wurde. Jedoch belegen unsere Daten die Wahrnehmung von Chinin durch mehrere *Tas2rs*, wie zuvor von Boughter postuliert (Boughter Jr. *et al.*, 1992).

Die simultane Aktivierung mehrerer *Tas2rs* durch einen Geschmacksstoff könnte die Wahrnehmung dieses Stoffes über einen größeren Konzentrationsbereich ermöglichen (Meyerhof *et al.*, 2010). Würden mit zunehmender Bitterkeit mehr *Tas2rs* aktiviert werden, wäre dies eine mögliche Erklärung wie ein Organismus bestimmt, welche Konzentration eines Bitterstoffes er toleriert und welche er ablehnt, da eine Aktivierung mehrerer Bitterrezeptoren eine Verstärkung der zellulären Antworten bewirken könnten, was einen intensiveren Bittereindruck zur Folge hätte, der vor dem Konsum toxischer Lebensmittel warnt.

Der überwiegende Anteil (57 %) der zur Aktivierung von *Tas2rs* führenden Bitterstoffe bedingte jedoch nur die Aktivierung eines einzelnen Rezeptors. Vergleichbare Zahlen (50 %) wurden zuvor auch für die humanen Bitterrezeptoren berichtet (Meyerhof *et al.*, 2010).

Darüber hinaus wird seit langem diskutiert, ob die Bitterkeit eines Geschmacksstoffs mit seiner Toxizität korreliert. Der Beweis eines solchen direkten Zusammenhangs steht jedoch bis heute aus (Glendinning, 1994). Unter meinen Ergebnissen ließen sich verschiedene Beispiele für eine solche Korrelation finden.

So konnte für das Alkaloid Strychnin, welches in den Samen der Gewöhnlichen Brechnuss (*Strychnos nux vomica*) vorkommt und bereits in geringen Mengen zu Muskelstarre führt, indem es am Rezeptor des inhibitorischen Neurotransmitters Glycin angreift (Zarbin *et al.*, 1981), aus den 16 getesteten Tas2rs für einen der Rezeptoren, dem Tas2r140, eine Aktivierung aufgezeigt werden (vgl. Tab. 4.1). Eine Aktivierung desselben oder eines anderen Rezeptors durch das strukturell sehr ähnliche Brucin, das natürlicherweise ebenfalls in der Brechnuss vorkommt und einen 75-fachen geringeren oralen LD₅₀-Wert (Chem ID plus; <http://toxnet.nlm.nih.gov>) aufweist, konnte jedoch nicht beobachtet werden. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass Brucin in höheren Konzentrationen eine solche Aktivierung hervorruft, jedoch wurde bereits beschrieben, dass die Wahrnehmung von Brucin an das Schmecken von SOA gekoppelt ist, welches zahlreiche Mausstämme nicht schmecken (Whitney & Harder, 1994; Boughter Jr. & Whitney, 1997). Die Beobachtung, dass die Maus eher Strychnin als Brucin wahrnimmt, korreliert demzufolge gut mit der Toxizität der Substanzen.

Auch konnten von den sieben toxischsten Verbindungen in unserem *Screening*, für die bei der Maus LD₅₀-Werte bekannt sind (Emetin, PROP, Strychnin, Nicotin, Cucurbitacin D & I, Colchicin, Picrotoxinin; LD₅₀-Werte zwischen 0,015 mg/kg KG und 8,98 mg/kg KG; vgl. Tab. 8.1; Chem ID plus; <http://toxnet.nlm.nih.gov>), sechs unter den 16 getesteten Bitterrezeptoren mindestens ein GPCR zugeordnet werden, der den Bittergeschmack dieser Stoffe vermittelt. Von Bitterstoffen, die hingegen als nicht-toxisch eingestuft wurden oder einen EC₅₀-Wert > 3000 mg/kg KG aufwiesen, wurde keiner der getesteten Tas2rs aktiviert.

Demgegenüber gab es auch Beispiele, die einen solchen Zusammenhang widersprachen. So konnten die beiden Sesquiterpenlactone Picrotoxinin und Picrotin, die sich strukturell nur durch eine Hydroxylgruppe unterscheiden, jedoch stark in ihrer Toxizität variieren, kein Zusammenhang zwischen Aktivierbarkeit von Bitterrezeptoren und Toxizität festgestellt werden. Picrotin ist mit einem LD₅₀-Wert (i.p.) von 135 mg/kg KG für die Maus 15-mal weniger toxisch als Picrotoxinin (Chem ID plus; <http://toxnet.nlm.nih.gov>). Beide Substanzen werden nach bisherigem Kenntnisstand über die Bitterrezeptoren Tas2r105 und Tas2r114 wahrgenommen (vgl. Tab. 4.1). Eine Korrelation zwischen Signalamplitude und Toxizität konnte allerdings bei beiden Rezeptoren nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 4.3 und 4.4). Auch führte Picrotin bei Tas2r114-transfizierten Zellen bereits bei einer Konzentration von 1 mM zu einer Ca²⁺-Ausschüttung, während für Picrotoxinin 3 mM für eine Aktivierung benötigt wurden (vgl. Abb. 4.2).

Folglich kann auch in der vorliegenden Arbeit keine eindeutig Aussage über die Korrelation von Bitterkeit und Toxizität entsprechend dieser Daten getroffen werden.

Die Kenntnisse über Spezifität und Affinität von verschiedenen Bitterstoffen und ihrer Rezeptoren steigern das Verständnis wie Bittersubstanzen wahrgenommen und diskriminiert werden. Auch hilft die Identifizierung der Bitterrezeptoragonisten physiologische Funktionen, bspw. auch in nicht-gustatorischen Geweben, besser zu verstehen.

Das Auffinden von Bitterrezeptoren im Gastrointestinaltrakt (Rozenfurt, 2006; Wu *et al.*, 2002, 2005; Wu *et al.*, 2002) beflügelte die Hypothese, dass Tas2rs im Darm die Stimulation von lokalen Hormonen beeinflussen, um so Bitterstoffe, die die erste Kontrolle (Zunge und Mundhöhle) passiert haben, an ihrer Absorption zu hindern bzw. eine beschleunigte Ausscheidung der Stoffe aus dem Körper zu gewährleisten (Jeon *et al.*, 2008; Janssen *et al.*, 2011; Glendinning *et al.*, 2008). Inzwischen konnte bestätigt werden, dass es Hormone (bspw. Progesteron) und Gallensäuren (bspw. Taurocholsäure) gibt, die zur Aktivierung von Tas2rs führen (vgl. Tab. 4.2) und so zur Regulation physiologischer Prozesse beitragen könnten.

Weiterhin ermöglicht die Darlegung der orthologen Beziehungen zwischen Mensch und Maus und die Identifizierung der Liganden der TAS2-Rezeptoren beider Spezies ein besseres Verständnis für die Interpretation und Übertragung von Daten aus Tierexperimenten auf den Menschen.

Die im Vergleich zu menschlichen Rezeptoren spezifischen Tas2rs der Maus machen deutlich, dass die vermutete Übertragbarkeit von bekannten Liganden der humanen Bitterrezeptoren auf die orthologen Rezeptoren der Maus nicht möglich ist. Auch scheint ein Cluster von Bitterrezeptoren in einer Spezies nicht das Ligandenspektrum einzelner orthologer Rezeptoren in einer anderen Spezies widerzuspiegeln.

Ob ein Tas2r durch einen Bitterstoff aktiviert wird oder nicht, kann folglich nur durch individuelle Prüfung auf Aktivierung einwandfrei festgestellt werden.

5.2 Erzeugung und Charakterisierung von genetisch veränderten Mausmodellen mit lichtsensitivem Geschmackssystem

Der Verzehr von Nahrungsmitteln führt zur Aktivierung komplexer neuronaler Schaltkreise. Die Analyse solch komplexer neuronaler Schaltkreise ist schwierig, da Neuronen innerhalb des Gefüges nur schwer einer Funktion zugeordnet werden kann. Eine früh angewandte Methode zur Untersuchung solch neuronaler Aktivitäten ist die elektronische Stimulation von Gehirnregionen. Verfahren wie diese haben den Nachteil, dass sie nur eine geringe räumliche Auflösung bieten, unspezifische Neuronentypen aktivieren und mechanische Schädigungen des Gewebes hervorrufen.

Eine neue Herangehensweise zur gezielten Initiation neuronaler Prozesse, unter Umgehung dieser Probleme, ist die Nutzung von Licht (Callaway, 2005; Callaway & Yuste, 2002; Kramer *et al.*, 2009). Die Stimulation neuronaler Prozesse mit Licht, bietet die Möglichkeit einer nicht-invasiven Methode, die eine hohe zeitliche und räumliche Auflösung gewährt. Hierbei kamen in den letzten Jahren vorrangig zwei Verfahren zum Einsatz. Eins davon ist die Verwendung von Neurotransmittern, die sich durch eine photolabile, schützende Gruppe auszeichnen, die sich bei Exposition mit Licht ablöst, sogenannte *caged*-Neurotransmitter (Lester & Nerbonne, 1982). Zurück bleibt eine bioaktive Verbindung, zumeist Glutamat (Wieboldt *et al.*, 1994; Dalva, 1994; Schubert *et al.*, 2001). Bedingt durch die Tatsache, dass verschiedene Neuronentypen im Gehirn von Säugetieren zumeist durch identische Neurotransmitter stimuliert werden, wird mit dieser Methode jedoch keine selektive Aktivierung von Neuronen in dem beleuchteten Hirnareal erzielt.

Das zweite Verfahren beruht auf der genetischen Einbringung von lichtaktivierbaren Sensoren in kultivierte Zellen und Organismen. Hierfür wurden zumeist Kanalrhodopsine (*Channelrhodopsin*, ChR), lichtsensitive Ionenkanäle der Grünalgen *Chlamydomonas* oder *Volvox* (Nagel *et al.*, 2002, 2003, 2005; Feldbauer *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2008), oder vereinzelt von Lichtenergie getriebene Chlorid- bzw. Protonenpumpen der Archeabakterien, das sogenannte Halo- bzw. Bakteriorhodopsin (Zhang *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2003), verwendet. In sehr seltenen Fällen kamen lichtsensitive Proteine des visuellen Systems von Invertebraten und Vertebraten (Rho, Opsin sws und mws) zum Einsatz.

Experimente mit dem Opsin sws der *Drosophila* verdeutlichten, dass es für die Aktivierung dieses Opsins nicht nur des Proteins des Photorezeptors, sondern weiterer Gene, die für Proteine der Sehkaskade kodierten, unter ihnen Arrestin und die α -Untereinheit eines G-Proteins, bedurfte (Zemelman *et al.*, 2002), um in Oozyten und Rattenneuronen des Hippocampus eine Aktivierung des Opsin sws durch Licht herbeizuführen.

Im Gegensatz dazu konnte in Neurone von Wirbeltieren eingebrachtes Rho über endogene Signalproteine native Ionenkanäle regulieren (Li *et al.*, 2005). Die beobachteten Nervenantworten traten jedoch zögerlich auf, waren nur von marginalem Umfang und variierten in der nervalen Antwort in Abhängigkeit vom neuronalen Zelltyp und dessen Ionenkanalausstattung. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Expression von Melanopsin, einem Photopigment, welches in lichtsensitiven Ganglienzellen der Retina exprimiert ist und die

circadiane Rhythmik reguliert, beobachtet (Lin *et al.*, 2008). Dies machte lichtensitive Proteine aus dem Tierreich für die Analyse neuronaler Aktivitäten in genetisch veränderten Mausmodellen weniger attraktiv als die Kanalrhodopsine der Mikroben.

Da lichtensitive Proteine des Tierreiches allerdings eine Signalkaskade anstoßen, die in den ersten Schritten den Signalkaskaden der Geschmacksqualitäten umami, süß und bitter gleicht, sollte in dieser Arbeit das Geschmackssystem durch die Einbringung von Opsinen unter Kontrolle von Geschmacksrezeptorpromotoren dieser drei Geschmacksmodalitäten manipuliert werden. Die Funktionalität eines Mausmodells, welches anstelle von Geschmackslösungen mit Licht definierter Wellenlänge stimuliert werden kann, eröffnet die Möglichkeit der Analyse gustatorischer Nervenbahnen unter Ausschaltung von geschmacksstoffassoziierten Stimuli.

Um die Funktionalität der angestrebten genetisch veränderten Mausmodelle vorab zu prüfen und die funktionelle Interaktion von Photorezeptoren mit der geschmacksspezifischen G-Proteinuntereinheit α -Gustducin experimentell zu belegen, wurden Oozyten vom Krallenfrosch *Xenopus laevis* mit dem Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Verfahren analysiert.

5.2.1 Nachweis der funktionellen Interaktion von Opsinen mit Gustducin

In-vitro-Experimente mit Oozyten stellen eine ideale Methode dar, um G-Protein-abhängige Signalwege zu visualisieren, da Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wie sie durch Aktivierung von PLC auftreten, in der Öffnung von Cl^- -Kanälen münden, die zu Veränderungen des Stromflusses führen (Gillo *et al.*, 1987; McIntosh *et al.*, 1987). Um die Funktionsweise der lichtsensitiven Proteine zu analysieren, wurden Opsin-injizierte Oozyten mit solchen verglichen, die zusätzlich zum Opsin Gustducin und PLC und/oder Poly(A)-RNA des Auges exprimierten.

Die Aufzeichnung der Stromkurven zeigte, dass die Stimulation von Opsin-injizierten Oozyten mit Licht teils in auswärtsgerichteten, transienten Ionenströmen mündete, die trotz anhaltender Belichtung zum Ausgangsniveau zurückkehrten. Die Auswärtsrichtung der Ströme war dem Haltepotential von 0 mV geschuldet, das positiver als das Ruhepotential der Oozyten war. Die Ionenströme traten in Übereinstimmung mit publizierten Daten nicht vor dem dritten Tag nach der Injektion auf (Knox *et al.*, 1993, 2000, 2003; Khorana *et al.*, 1988; Mole *et al.*, 1996). Auch konnten keine Unterschiede im Reaktionsverhalten der injizierten Oozyten auf Lichtstimuli zwischen den Messungen am dritten oder vierten Tag beobachtet werden. Generell unterlagen die lichtinduzierten Stromänderungen der Oozyten einer großen individuellen Variabilität von keiner Reaktion bis hin zu Stromänderungen von mehreren μA . Solche Abweichungen in der Oozytenreaktion auf die gleichen Stimuli decken sich mit den erhobenen Daten von Knox, der Variationen in der Reaktion von Rho-injizierten Oozyten von 10 nA bis 200 nA, einhergehend mit einem häufigen Ausbleiben von Stromänderungen, berichtete (Knox *et al.*, 2000).

Die beobachtete Lichtempfindlichkeit ließ den Rückschluss zu, dass die Opsine, unabhängig von Art und Ursprung, funktionell in *Xenopus*-Oozytenmembranen exprimiert wurden. Die verschiedenen Opsine reagierten dabei mit einer variierenden Empfindlichkeit gegenüber dem Lichtstimulus nach Inkubation mit dem Kofaktor 11-*cis*-Retinal.

Das murine Opsin sws wies im Vergleich zum humanen Rho und dem murinen Opsin mws die geringste Signalamplitude als Antwort auf einen einmaligen Lichtstimulus auf (vgl. Tab. 4.4). Hierbei wurden Opsin-sws-injizierte Oozyten mit kurzwelligem Licht stimuliert, während Oozyten, die mit Rho oder Opsin mws injiziert wurden, mit Weißlicht exponiert wurden. Die geringe Signalamplitude von Opsin-sws-injizierten Oozyten ist höchstwahrscheinlich auf die nicht optimale Anregung des Opsins zurückzuführen, da die maximale Anregungswellenlänge für Opsin sws 359 nm beträgt, die Stimulation aber mit einer UV-Lampe mit einer Anregungswellenlänge von 312 nm erfolgte. Spätere Experimente mit variierenden Lichtquellen (vgl. Abb. 4.13, Tab. 4.9) zeigten deutlich, dass die Stimulation von Opsin-sws-injizierten Oozyten mit einer UV-Licht-Quelle von 365 nm signifikant höhere Signalamplituden ergab.

Die optimale Anregungswellenlänge für Rho liegt hingegen bei 497 nm, die des Opsin mws bei 508 nm. Beide Wellenlängen liegen im Bereich des Weißlichts (400 nm bis 750 nm), mit dem die entsprechenden Oozyten stimuliert wurden und gewährleisteten die Anregung jener Opsine. Lichtquellen, die ausschließlich Licht von ~ 500 nm aussenden, könnten ebenfalls höhere Signalamplituden hervorrufen, standen jedoch nicht zur Überprüfung dieser Vermutung zur Verfügung.

Neben der Diskrepanz der optimalen Anregung der Oozyten könnten die variierenden Signalamplituden der Photorezeptoren auch auf einen unterschiedlich effizienten Einbau der Opsine in die Oozytenmembran zurückzuführen sein. Weiterhin wären auch unterschiedlich stark ausgeprägte Interaktionen der verschiedenen Opsine mit dem G-Protein Gustducin beziehungsweise endogenen G-Proteinen als Erklärung denkbar. Diese Wechselwirkungen scheinen im Vergleich zu Rho bei den Zapfenopsinen stärker ausgeprägt zu sein, wie die deutlich häufigere Antwort (~ 50 %) der mit den Opsinen der Zapfen injizierten Oozyten im Vergleich zu den mit Rho-injizierten Oozyten (~ 30 %) vermuten lässt (vgl. Tab. 4.4). Dies könnte einerseits auf abweichende Eigenschaften der Opsine in den Stäbchen und Zapfen deuten. Andererseits könnten hier auch speziesbedingte Unterschiede zum Tragen kommen, da die Zapfenopsine beide murinen Ursprungs waren, während die Rho-Sequenz für das humane Opsin der Stäbchen kodierte. Solche speziesabhängigen Unterschiede wurden bereits von Knox beim Vergleich von bovinem und *Limulus*-Rho, dem Rho des Pfeilschwanzkrebse, beobachtet (Knox *et al.*, 2000). Demgegenüber ist allen Opsinen gemein, dass Oozyten, die Opsin, Gustducin und PLC exprimierten, zwei- bis dreimal häufiger sensitiv für Licht waren, als Oozyten, die nur mit dem jeweiligen Opsin injiziert wurden. Auch zeigten Oozyten, denen nur Opsin injiziert wurde, eine geringere Signalamplitude bei Stimulation mit Licht als Oozyten, die auch Proteine der gustatorischen Signalkaskade exprimierten (vgl. Tab. 4.4 und 4.6).

Die Koinjektion von Poly(A)-RNA führte zur weiteren Steigerung der Aktivierbarkeit (vgl. Abb. 4.6). Dies deckt sich mit publizierten Daten der Arbeitsgruppen um Nasi und Knox. Mole berichtete, dass die Injektion von Poly(A)-RNA der *Limulus*-Retina, die Aktivierung von fünf von zehn Oozyten durch Lichtstimuli bedingte (Mole *et al.*, 1996). Die Injektion von *Limulus*-Rho-kodierender cRNA in *Xenopus*-Oozyten mündete hingegen trotz Inkubation mit 11-*cis*-Retinal und Nachweis der Expression in keine lichtinduzierten Stromänderungen (Knox *et al.*, 1993). Dies lässt vermuten, dass die Opsine durch potentielle Hilfsfaktoren in der Poly(A)-RNA

effizienter zur Oozytenmembran transportiert und eingebaut werden und/oder die Interaktionen mit den Signalkaskadenkomponenten wie G-Proteinen erleichtert wird.

Ableitend aus den Erkenntnissen der Geruchs- und Geschmacksforschung, wo Hilfsproteine wie REEP (*receptor expression enhancing protein*) und RTPs (*receptor transport proteins*) für eine effizientere Signalweiterleitung beschrieben sind (Behrens *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2004; Ilegems *et al.*, 2010), kann vermutet werden, dass sich solche Proteine auch in der injizierten Poly(A)-RNA befanden und zur Steigerung der Signalamplituden bei Poly(A)-injizierten Oozyten beigetragen haben. Um diese Hilfsproteine zu identifizieren, müssten *Expressionsscreens* von cDNA-Bibliotheken aus Mausaugen in weiteren Oozytenexperimenten durchgeführt werden. Die Identifikation dieser Hilfsproteine könnte auch für die weitere Erforschung des Geruchs- und Geschmackssinns von Bedeutung sein.

RT-PCR-Analysen der in den Oozytenexperimenten verwendeten Poly(A)-RNA bestätigten ferner die Expression von lichtsensitiven GPCRs und dem G-Protein Transducin (vgl. Abb. 4.9). Weiterhin konnte die mRNA von Gustducin und PLC in der Poly(A)-RNA aus Mausaugen nachgewiesen werden. Die Expression von Gustducin im Auge wurde erstmals 2009 per PCR dargelegt (Fenech *et al.*, 2009) und mittels *Western Blot* und Immunhistochemie durch Son *et al.* (2011) bestätigt.

Basierend jedoch auf den beschriebenen Expressionsorten der zwei G-Proteine kann abgeleitet werden, dass eine Koexpression von Transducin und Gustducin im Auge nicht vorliegt (Son *et al.*, 2011; Lobanova *et al.*, 2010). Eine funktionelle Substitution der G-Proteine untereinander, wie sie im gustatorischen Gewebe auftritt, scheint folglich im Auge nicht vorzuliegen. Dennoch belegen die erhaltenen Daten, dass Gustducin nicht nur funktionell mit Geschmacksrezeptoren, sondern auch mit Photorezeptoren interagieren kann.

Die lichtabhängige Aktivierung der Opsine wurde dabei nicht nur in Anwesenheit von 11-*cis*-Retinal, sondern auch entgegen publizierter Daten von Knox *et al.* (1993, 2003) in Anwesenheit von belichtetem 11-*cis*- und all-*trans*-Retinal beobachtet (vgl. Tab. 4.5). Die Häufigkeit dieser Opsinaktivierungen variierte dabei kaum oder gar nicht zwischen den verschiedenen Retinalen. Jedoch zeigten Oozyten, die mit 11-*cis*-Retinal inkubiert wurden, eine tendenziell, aber statistisch nicht signifikant höhere Signalamplitude als Oozyten, die mit belichtetem 11-*cis*- oder all-*trans*-Retinal inkubiert wurden.

Die Belichtung von 11-*cis*-Retinal führt innerhalb von Sekundenbruchteilen zur Konformationsänderung des 11-*cis*-Retinals zu all-*trans*-Retinal (Jensen *et al.*, 1989). Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass all-*trans*-Retinal in alkoholischer Lösung unter Licht zu ~ 25 % zu 11-*cis*-Retinal isomerisiert, während der größere Anteil weiterhin als all-*trans*-Retinal und ein kleinerer Anteil als 13-*cis*-, 9-*cis*- und 7-*cis*-Retinal vorliegt (Brown & Wald, 1955; Waddell & Hopkins, 1977; Denny & Liu, 1977; Waddell & Chihara, 1981). Diese Reaktion ist dabei stark von Lösungsmittel und Intensität der Lichtquelle abhängig (Jensen *et al.*, 1989; Denny & Liu, 1977). Die ausgebliebene Aktivierung der Oozyten bei Inkubation mit all-*trans*-Retinal, wie sie von Knox berichtet wurde (Knox *et al.*, 1993, 2003), könnte daher auf eine fehlende Umsetzung von all-*trans*- zu 11-*cis*-Retinal zurückzuführen sein. Die tendenziell

höheren Signalamplituden bei 11-*cis*-Retinal-inkubierten Oozyten sind dabei wahrscheinlich dem höheren Anteil an verfügbarem 11-*cis*-Retinal geschuldet.

Eine andere Möglichkeit für diese Beobachtung wäre, dass die Oozyten selbst 11-*cis*-Retinal enthielten und die Zugabe von externem Retinal nicht notwendig gewesen wäre. Eine Prüfung der Aktivierbarkeit von Opsin-injizierten Oozyten ohne 11-*cis*-Retinal ist jedoch meinerseits nicht erfolgt. Auch würde dies den Beobachtungen um die Arbeitsgruppe von Knox widersprechen. Diese beschrieb nicht nur, dass keine Aktivierung von bovinem Rho in Anwesenheit von all-*trans*-Retinal möglich ist, sondern zeigte auch, dass die Injektion von *Limulus*-Rho-kodierender cRNA in *Xenopus*-Oozyten trotz Inkubation mit 11-*cis*-Retinal und Nachweis der Expression des Proteins in keinen lichtinduzierten Stromänderungen mündete (Knox *et al.*, 1993, 2003). Er schloss daraus, dass das Chromophor nicht in der Lage sei, an das Opsin zu binden. Meine Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass weniger die Kopplung des Chromophors als vielmehr die Präsenz von weiteren Proteinen der Signalkaskade die Sensitivität gegenüber Licht bestimmt. Vermutlich bewirkt die Anwesenheit eines G-Proteins und des Enzyms PLC eine verstärkte Freisetzung von Ca²⁺ aus internen Speichern. Dies würde eine länger anhaltende Öffnung der endogenen Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanäle in der Oozytenmembran nach sich ziehen, welche das Messsystem als Änderung in der Stromkurve der Oozyten detektiert.

Die erhöhte Anzahl lichtsensitiver Oozyten bei Koinjektion von Opsin mit Gustducin und PLC lassen den Schluss zu, dass das humane Rho und die murinen Opsine (sws und mws) mit dem geschmacksspezifischen G-Protein Gustducin funktionell interagieren können.

Daraus lässt sich ableiten, dass die Opsine die Geschmacksrezeptoren als erste Instanz der Geschmackskaskade prinzipiell ersetzen können. Die Stimulation der Zungen der angestrebten Mausmodelle zur Untersuchung der Kodierung von Geschmacksinformationen mit Licht definierter Wellenlänge sollte folglich die Induktion der gustatorischen Signalkaskade bewirken. Eine Koinjektion von weiteren Lichtsignalkaskaden-Elementen für die Funktionalität der Opsine in diesen Mausmodellen, wie von Zemelman *et al.* (2002) beschrieben, wäre nach der vorliegenden Datenlage nicht notwendig. Eine abschließende Gewissheit über die Funktionalität dieses Signalweges im gustatorischen System kann jedoch nur durch die Analysen der Mäuse selbst gewonnen werden, da native Prozesse wie posttranslationale Modifikationen (bspw. Glycosylierung und Palmytylierung), Unterschiede in Aktivität und Effektivität der beteiligten Proteine im Vergleich zum *In-vitro*-System hervorrufen können (Goc *et al.*, 2008).

Gleiches gilt auch für die Lichtsensitivität der Opsine. Hier mussten bereits vereinzelte Abweichungen zwischen den in den Oozyten-Experimenten gewonnenen Daten und der in der Literatur publizierten Lichtempfindlichkeiten festgestellt werden. 1998 beschrieb Yokoyama, dass trotz eines UV-Bereiches von 40 nm bis 370 nm, UV-Pigmente nur durch einen engen Wellenlängenbereich um 360 nm aktiviert werden (Yokoyama *et al.*, 1998). In Übereinstimmung mit dieser Aussage beobachtete ich ebenfalls für das Opsin sws ausschließlich eine Lichtsensitivität gegenüber UV-Licht mit einer maximalen Aktivierbarkeit um 365 nm (vgl. Abb. 4.13). Demgegenüber zeigten Rho und das Opsin mws in den Oozytenexperimenten ein sehr breites Anregungsspektrum (vgl. Abb. 4.11 bis 4.12). Für Rho wurde in der Literatur eine Aktivierbarkeit mit Licht zwischen ~ 400 nm und ~ 600 nm (Allen *et al.*, 2010; Shichi & Somers

et al., 1974; Shichida & Imai, 1998) beschrieben, während für das Zapfenopsin mws eine Empfindlichkeit gegenüber Licht der Wellenlängen von ~ 400 nm bis ~ 700 nm (Sun *et al.*, 1997; Shaaban *et al.*, 1998; Nikonov *et al.*, 2006) berichtet wurde. Eine Aktivierbarkeit der Rho- und Opsin-mws-injizierten Oozyten durch Weißlicht und Rotlicht (nur für Opsin mws) war daher zu erwarten (vgl. Abb. 4.11 und 4.12). Die starke Lichtempfindlichkeit dieser Opsine gegenüber UV-Licht war jedoch überraschend. Weisen diese Opsine wirklich ein so breites Aktivierungsspektrum auf oder sind diese Beobachtungen auf das verwendete *In-vitro*-System zurückzuführen?

Fakt ist, dass die Umgebung und damit die zelluläre Ausstattung zwischen der Retina des Auges und den Oozyten – als angewandtes *In-vitro*-System – variiert. So könnten pH-Bedingungen und die An- bzw. Abwesenheit von Hilfsproteinen unterschiedliche Faltungen, Konformationen und Lokalisationen der Proteine sowie Variationen in der Stabilität des Opsin-G-Protein-Komplexes bedingen, die sich möglicherweise auch in der Funktionalität und Aktivierbarkeit niederschlagen.

Weiterhin konnte dargelegt werden, dass auch der Gehalt am G-Protein Transducin im Außensegment der Photorezeptoren des Auges die Sensitivität gegenüber Licht bestimmt (Pugh & Lamb, 1993; Sokolov *et al.*, 2002). Dabei scheint insbesondere die α -Untereinheit des zu aktivierenden G-Proteins eine wichtige Rolle in der Bestimmung physiologischer Eigenschaften zu spielen. So zeigten Chen und Kollegen/innen, dass die Expression der α -Transducin-Untereinheit der Zapfen (GNAT2) in den Stäbchenzellen des Auges die Sensitivität und Aktivierbarkeit der Signalkaskade der Stäbchen herabsetzt (Chen *et al.*, 2010). Folglich könnte auch die Kopplung von Gustducin anstelle von Transducin an das Opsin sowie dessen Konzentration für die beobachteten Variationen im Aktivierungsspektrum verantwortlich sein.

Ob sich die Opsine im gustatorischen Gewebe wie in den Oozytenexperimenten verhalten oder doch nur durch ein relativ enges Spektrum an Licht aktiviert werden können, muss daher ebenfalls im Mausmodell eingehend geprüft werden.

5.2.2 Erzeugung der genetisch veränderten Mausmodelle

Um die neuronalen Netzwerke für die Wahrnehmung verschiedener Geschmacksqualitäten unter Ausschaltung geschmacksstoffassoziierter Stimuli zu visualisieren, sollten drei Mausmodelle generiert werden. In diesen Mausmodellen sollten die kodierenden Sequenzen der Geschmacksrezeptoren Tas1r1, Tas1r2 bzw. Tas2r114 durch die cDNA-Sequenz verschiedener Opsine ersetzt werden. Basierend auf den Experimenten von Zhao *et al.* (2003) und Mueller *et al.* (2005), die zeigten, dass Geschmacksrezeptorzellen auf eine Geschmacksmodalität festgelegt sind, wurde angenommen, dass der Ersatz eines Geschmacksrezeptors durch einen Photorezeptor in ein für eine Geschmacksmodalität spezifisches, lichtsensitives Geschmackssystem mündet, das durch Licht definierter Wellenlänge aktiviert werden kann.

Hierfür wurden ES-Zellen einer Locus-spezifischen Modifikation durch homologe Rekombination unterzogen. Diese erlaubt die gezielte Manipulation eines Genortes und besitzt gegenüber anderen Methoden den Vorteil, dass Integrationsort und -häufigkeit bekannt sind.

5.2.2.1 Identifizierung eines homologen Rekombinationsereignis im Geschmacksrezeptorlocus

Die Modifikation eines Genlocus durch homologe Rekombination basiert auf dem Austausch von Sequenzabschnitten zwischen zwei DNA-Strängen mit gleicher oder ähnlicher Sequenz. Um eine Änderung der kodierenden Sequenz im *Tas1r1*-, *Tas1r2*- bzw. *Tas2r114*-Locus herbeizuführen, wurden die homologen Sequenzbereiche, die 5' und 3' zu der Rezeptorsequenz lagen, für die Generierung eines *Targeting*-Vektors genutzt. Die zwei homologen Sequenzabschnitte flankierten in jenen *Targeting*-Konstrukten die cDNA-Sequenz der Opsine und die Selektionskassette ACN. Diese Methode erlaubt die komplette Ersetzung der kodierenden Sequenz der Geschmacksrezeptoren unter Einbringung von *Knockin*-Sequenzen, die unter Kontrolle der natürlichen gustatorischen Rezeptorpromotoren exprimiert werden.

Die Häufigkeit, mit der ein homologes Rekombinationsereignis auftritt, ist gering und ist abhängig von der Zugänglichkeit des zu manipulierenden Locus, der Größe und dem Grad der Analogie der homologen Bereiche (Brinster *et al.*, 1989). Je größer die Sequenzähnlichkeit zwischen *Targeting*-Vektor und dem Zielgen in der murinen ES-Zell-DNA, umso spezifischer die Rekombination. Zur Steigerung der Wahrscheinlichkeit des Ereignisses, sollte die Gesamtlänge der homologen Bereiche nicht kleiner als 1,7 kb sein (Hasty *et al.*, 1991; Thomas & Capecchi, 1987; Deng & Capecchi, 1992). Längere homologe Bereiche mit möglichst wenigen repetitiven Sequenzen steigern zusätzlich die Effektivität der Rekombination.

Für die angestrebte Rekombination zwischen den homologen Bereichen der *Targeting*-Vektoren und der murinen ES-Zell-DNA wurden homologe 5'- und 3'-Abschnitte zwischen 1,2 kb und 3,8 kb verwendet. Die Modifikation der Umami-Rezeptoruntereinheit *Tas1r1* erfolgte durch *Targeting*-Konstrukte, die homologe Bereiche von 6,1 kb umfassten (vgl. Abb. 4.15). Die Analyse der ES-Zellen, die mit einem *Targeting*-Konstrukt für den *Tas1r1*-Locus elektroporiert wurden, welches neben den homologen Sequenzen für Rho und ACN kodierte, brachte keinen ES-Zellklon hervor, der die gewünschte Rekombination trug. Erst die Erweiterung des *Targeting*-Konstruktes um IRES-hrGFP führte zur Identifizierung zweier homolog rekombinierter ES-Zellklone (vgl. Abb. 4.20). Die Rekombinationshäufigkeit des *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Konstruktes betrug 0,8 %. Die homologen Bereiche zur Manipulation der Süß-Rezeptoruntereinheit *Tas1r2* umfassten 3,2 kb (vgl. Abb. 4.17). Eine Erweiterung der homologen Bereiche, insbesondere des 5'-Fragmentes, wurde auf Grund repetitiver Sequenzen nicht umgesetzt. Unter den analysierten ES-Zellklonen, die mit dem *Tas1r2^{Opsin mws}*-Vektor elektroporiert wurden, zeigte einer von 339 Klonen die gewünschte Rekombination (vgl. Abb. 4.20). Für die Manipulation des *Tas2r114*-Locus konnte ebenfalls ein Klon aus 54 analysierten ES-Zellklonen mit der erhofften homologen Rekombination identifiziert werden (vgl. Abb. 4.20). Die homologen 5'- und 3'-Fragmente des hier verwendeten *Targeting*-Konstruktes umfassten 4,4 kb (vgl. Abb. 4.19).

Die über Elektroporation erfolgreich in die ES-Zellen des Mausstammes 129/Sv eingebrachten *Targeting*-Konstrukte variierten folglich in ihren Rekombinationshäufigkeiten zwischen 0,3 % und 1,9 %. Dabei fiel die Rekombinationshäufigkeit der *Tas1r*-Loci zwei- bis sechsmal geringer aus, als die des *Tas2r114*-Locus. Dies könnte einerseits auf die Größe der kodierenden Region der *Tas1rs* zurückzuführen sein. Bedingt durch die Exon-Intron-Struktur der *Tas1r*-Gene mussten für die vollständige Entfernung der kodierenden Regionen 10,7 kb bzw. 16,7 kb ersetzt werden. Dies sollte durch *Targeting*-Konstrukte mit einer *Knockin*-Sequenz von etwa 4,8 kb erfolgen. Demgegenüber mussten für die kodierende Region des *Tas2r114*-Locus nur 930 bp durch die Integration von *Opn sws* und ACN-Kassette substituiert werden. Der Einfluss der Größe der zu ersetzenden kodierenden Rezeptorregion wird durch die erfolgreiche Rekombination des um etwa 1645 bp verlängerten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}-Targeting*-Vektors bekräftigt.

Die Rekombinationshäufigkeit wird weiterhin durch den Vektoraufbau des *Targeting*-Konstruktes, die Zelllinie, die Elektroporationskonditionen und die chromosomale Position, in die der Vektor integrieren soll, beeinflusst (Araki *et al.*, 1997). Insbesondere die Loci der *Tas1rs* befinden sich dabei in unmittelbarer Nähe zu den weniger zugänglichen Telomeren des Chromosoms vier, während der *Tas2r114*-Locus etwas zentraler auf Chromosom sechs gelegen ist (www.ensembl.org).

Vor Einsatz der Elektroporation wurde das *Targeting*-Konstrukt linearisiert und aufgereinigt. Eine vollständige Linearisierung ist Voraussetzung für eine effiziente Rekombination, da die Elektroporation von linearisierten *Targeting*-Konstrukten häufiger zur Integration ins Genom führt als zirkuläre DNA (Brinster *et al.*, 1985). Die Linearisierung der Konstrukte wurde vor der Verwendung mittels Gelelektrophorese auf Vollständigkeit überprüft.

Ein weiterer Parameter, der die Elektroporationskonditionen neben Anzuchtbedingungen, Pufferzusammensetzung und DNA-Konzentration bestimmt, ist die Elektroporationskonstante. Sie ist ein Indikator für die Effizienz der Transfektion und beschreibt die Zeit, die benötigt wird, um die angelegte Spannung auf 37 % abfallen zu lassen. Die Elektroporationskonstante sollte einen Wert zwischen 5,8 ms und 6,4 ms annehmen. Elektroporationskonstanten deutlich größer als 6,4 ms gehen mit einer starken Belastung der Zellen einher, die die Vitalität der Stammzellen herabsetzt. Den Elektroporationen der verschiedenen *Targeting*-Konstrukten war eine vergleichbare Elektroporationskonstante zwischen 6,1 ms und 6,5 ms gemein.

Eine variierende Anzucht einzelner ES-Zellklone, sowie unterschiedlich effiziente Inkubationen der ES-Zell-DNA mit Restriktionsendonukleasen und Hybridisierungen mit den entsprechenden Sonden im *Southern Blot*, könnten experimentelle Unterschiede in der Rekombinationshäufigkeit der einzelnen *Targeting*-Vektoren bedingt haben. Insbesondere für *Tas2r114^{Opn sws}* konnte, bedingt durch einen ineffizienten Restriktionsverdau, nur einem kleinen Teil der angezüchteten ES-Zellen ein eindeutiger Genotyp zugeordnet werden (vgl. Abb. 4.20).

ES-Zellen, die eine homologe Rekombination für den jeweiligen Geschmacksrezeptorlocus aufwiesen, wurden nachfolgend in Blastocysten verbracht, wo sie ihre Entwicklung fortsetzten (Nagy *et al.*, 1993). Dies führte zur Generierung von chimären Mäusen. Im Vergleich zu den Chimären der Linien *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}* und *Tas2r114^{Opn sws}* bei denen die einmalige Injektion

des homolog rekombinierten ES-Zellklones zu hochchimärem Nachwuchs führte, bedurfte es für Tas1r2^{Opsin mws} sieben Injektionen desselben homolog rekombinierten ES-Zellklones bis keimbahngängige Chimären geboren waren.

Die Generierung der Chimären zeigte einerseits, dass die injizierten ES-Zellklone ihre pluripotenten Eigenschaften über ihre Kultivierung nicht verloren hatten, machten andererseits aber auch deutlich, dass die Erzeugung genetisch veränderter Organismen ein sehr sensibles Verfahren ist. Durch den Erhalt der Fähigkeit zur Bildung von Keimzellen und dem Ausbleiben von Spontanmutationen während der Zellkultur reichte für jede der drei erzeugten Mauslinien ein ES-Zellklon aus, um Chimären zu gewinnen und eine stabile Mauslinie (B6;129Sv-Tas1r1^{tm1.1Rhodopsin-IRES-hrGFP}; B6;129Sv-Tas1r2^{tm1.1Opsin mws}; B6;129Sv-Tas2r114^{tm1.1Opsin sws}) zu erzeugen.

5.2.2.2 Nachweis der Entfernung der Selektionskassette

Für die Generierung dieser zielgerichtet veränderten Mäuse wurden ES-Zellen mit einem *Targeting*-Vektor transfiziert. Um rekombinierte ES-Zellklone zu selektionieren, wurden diese während ihrer Kultivierung mit G418 inkubiert. Grundlage hierfür war die Integration einer Selektionskassette (ACN), die ein Resistenzgen samt Promotor enthielt. Da die Integration eines zusätzlichen Promotors ins Genom die Expression anderer Gene beeinflussen oder unerwünschte Effekte haben kann (Ramirez-Solis *et al.*, 1993; Fiering *et al.*, 1995; Meyers *et al.*, 1998; Nagy *et al.*, 1998; Scacheri *et al.*, 2001), wird die Entfernung solcher Selektionskassetten befürwortet. Um zusätzliche Schritte für die Beseitigung der Selektionskassette zu umgehen, wurde für die Generierung der drei Mauslinien eine mit Cre-Rekombinase-Erkennungsstellen (*LoxP*) flankierte Neomycin-Resistenz-Kassette mit einer spezifisch in der männlichen Keimbahn aktivierten Cre-Rekombinase (Bunting *et al.*, 1999) verwendet (vgl. Abb. 4.14, 4.16 und 4.18). Die Aktivierung des Cre/*LoxP*-Systems unter Kontrolle des tACE-Promotors erlaubt die Entfernung der Resistenzkassette zwischen den *LoxP*-Sequenzen während der Spermatogenese (Kos, 2004; Nagy, 2000).

Die Analyse genomischer DNA von Nachwuchs aus der Verpaarung von Chimären mit C57BL/6-Tieren mittels *Southern Blot* zeigte bei allen drei Linien die erfolgreiche Entfernung der ACN-Kassette (Abb. 4.22 bis 4.24). Das Auftreten von Promotoreffekten in diesen Mauslinien kann damit ausgeschlossen werden.

5.2.2.3 Untersuchung der Mausmodelle mit manipuliertem Geschmacksrezeptorlocus

Die Untersuchung der Expression von Geschmacksrezeptoren erfolgte bis heute, bedingt durch das Fehlen funktioneller Antikörper, überwiegend auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und *In-situ*-Hybridisierung. Neuere Vorstöße, die Geschmackswahrnehmung weiter aufzuklären, beruhen daher vorrangig auf der Generierung und Analyse von genetisch modifizierten Mauslinien.

Für die Untersuchung der peripheren und zentralen Kommunikationsbahnen der Geschmacksqualitäten umami, süß und bitter wurden im Zuge dieser Arbeit die Mauslinien *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*, *Tas1r2^{Op sin mws}* und *Tas2r114^{Op sin sws}* erzeugt. Bedingt durch die Modifikation eines Geschmacksrezeptorlocus sollten die Geschmacksrezeptorzellen dieser Tiere einen Photorezeptor bzw. im Fall der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Linie zusätzlich das stationäre Markerprotein hrGFP an Stelle eines Geschmacksrezeptors exprimieren.

Die erfolgreiche Modifikation der Geschmacksrezeptorloci durch Integration von Opsin-cDNA-Sequenzen in den drei Mausmodellen konnte auf Expressionsebene durch RT-PCR-Analysen bestätigt werden (vgl. Tab. 4.11 bis 4.13). So konnte in der Mehrheit der Organe, in denen in C57BL/6-Mäusen eine Expression eines Geschmacksrezeptors aufgezeigt wurde, in homozygoten Nachkommen der genetisch veränderten Mäuse die Expression des entsprechenden Photorezeptors nachgewiesen werden.

Einzelne Diskrepanzen in der Expressionsanalyse der Rezeptoren konnten zumeist durch die Verdopplung der Matrizenmenge überwunden werden. Dennoch waren wenige Rezeptoren, insbesondere im heterozygoten Tier nicht detektierbar, was vermutlich auf eine zu geringe mRNA-Kopienzahl der einzelnen Rezeptoren im Gesamtgewebe zurückzuführen ist. Auch könnten Unterschiede im Alter der Tiere, welches zwischen fünf und zwölf Wochen lag, für diese Unstimmigkeiten verantwortlich sein. Weiterhin könnten Variationen in der Rezeptorexpression auch im genetischen Hintergrund der Tiere begründet sein, da die genetisch veränderten Mäuse ein Hybrid aus C57BL/6 und 129/Sv sind.

Die vorgenommenen Analysen erfolgten dabei stets mit einem Primerpaar für einen Rezeptor. Da RT-PCR-Primer in ihren Effizienzen variieren können, müssten streng betrachtet diese PCR-Ergebnisse durch die Nutzung anderer Primer validiert werden.

Dessen ungeachtet belegen die drei Mausmodelle die Expression der Geschmacksrezeptoren auch außerhalb des gustatorischen Gewebes. Insbesondere für die *Tas1rs* konnte in den meisten Geweben der C57BL/6-Maus eine Expression der mRNA nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4.11 und 4.12). Die Untersuchung der Expression des hrGFPs, welches durch eine BGH-Sequenz (*bovine growth-hormone polyadenylation signal*) einer größeren Stabilität unterliegt, zeigte sogar, dass alle betrachteten Organe einen aktiven *Tas1r1*-Promotor aufwiesen, was für eine ubiquitäre Expression von *Tas1r1* spricht. Die biologische Funktion der Geschmacksrezeptoren in den zahlreichen nicht-gustatorischen Organen ist jedoch bis dato weitestgehend ungeklärt, steht aber in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. So wurden Geschmacksrezeptoren in Analogie mit meinen Ergebnissen im Nasenepithel (Finger *et al.*, 2003; Tizzano *et al.*, 2011; Thomas *et al.*, 1996), Gastrointestinaltrakt (Bezencon *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2002, 2005; Rozengurt, 2006; Cumming & Overduin, 2007; Rozengurt & Sternini, 2007; Dyer *et al.*, 2005), Pankreas (Nakagawa *et al.*, 2009; Taniguchi, 2004); Leber (Taniguchi, 2004), Niere (Kiuchi *et al.*, 2006), Thymus (Max *et al.*, 2001), Lymphozyten (Kiuchi *et al.*, 2006) und Hoden (Iwatsuki *et al.*, 2010, Thomas *et al.*, 1996; Kitagawa *et al.*, 2001; Kiuchi *et al.*, 2006; Max *et al.*, 2001; Matsunami *et al.*, 2000) nachgewiesen.

Die Expression des Tas1r2-Rezeptors wurde für einzelne Organe bereits zuvor von Iwatsuki anhand einer *Tas1r2-Knockout-Maus* ($T1R2^{lacZ/lacZ}$) untersucht. Dieser beschrieb in Übereinstimmung mit den von mir erhobenen Daten ebenfalls eine Tas1r2-Expression in Abschnitten des Darms und im Hoden (Iwatsuki *et al.*, 2010), während eine Detektion von Tas1r2 im Magen weder mittels RT-PCR, noch mittels X-Gal-Färbung von Iwatsuki beobachtet werden konnte.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde ferner überraschenderweise die Expression muriner Opsine in nicht-visuellen Geweben beobachtet. Belege für eine solche Expression von visuellen Opsinen außerhalb des Auges konnten in der Literatur, mit Ausnahme der Zirbeldrüse, nicht gefunden werden (Blackshaw & Snyder, 1997; Korf *et al.*, 1985). Dies ist eventuell dem Umstand geschuldet, dass die Expression von Zapfenopsinen außerhalb des Auges bisher nicht untersucht oder auf Grund einer sehr geringen Expression übersehen wurde. Die Opsine könnten dabei nicht-visuelle Funktionen ausüben, wie sie für andere nicht-visuelle Opsine im Gehirn, der Zirbeldrüse, der Haut oder der Retina beschrieben wurden (Vigh *et al.*, 2002; Gooley *et al.*, 2003; Blackshaw & Snyder, 1999; Peirson *et al.*, 2009; Van Gelder, 2003). Möglich ist auch, dass diese Ergebnisse, trotz korrekter Größe des Amplifikationsproduktes, einer unspezifischen Vervielfältigung in jenen Geweben geschuldet sind.

Der *Knockout* der Geschmacksrezeptoren und der *Knockin* der Opsine konnte ferner mittels *In-situ*-Hybridisierung auf RNA-Ebene visualisiert werden (vgl. Abb. 4.26, 4.30 und 4.31). Hierbei wurde deutlich, dass der Bitterrezeptor Tas2r114 im Vergleich zu anderen Geschmacksrezeptoren eine sehr geringe Expression aufweist. Dies betraf sowohl die Anzahl an exprimierenden Geschmacksrezeptorzellen als auch die Expressionsstärke in jenen Zellen. Die Beobachtung konnte durch meine Kollegin Sandra Hübner (DIfE, persönliche Mitteilung) durch quantitative RT-PCR-Analysen bestätigt werden.

Die Hybridisierung von Gewebeschnitten der *Knockout*-Tiere mit einer gegen Gustducin gerichteten Sonde, als auch der Nachweis des Gustducins auf Proteinebene, ließen keine Unterschiede im Aufbau der Geschmacksknospen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen erkennen. Die Struktur der Geschmackseinheiten schien folglich nicht durch den Verlust eines Geschmacksrezeptors beeinträchtigt zu sein.

In zwei der drei Mausmodelle gelang ferner der Nachweis der *Knockin*-Strukturen (Rho, Opsin sws und hrGFP) auf Proteinebene. Immunhistochemische Analysen von Gewebeschnitten homozygoter *Knockout-Knockin*-Tiere zeigten eine Kolokalisation von hrGFP und Opsin sws mit dem Markerprotein für Geschmacksrezeptorzellen PLC β 2. Die Kolokalisationsstudie ergab, dass hrGFP- und Opsin-sws-positive Zellen eine Subpopulation der Geschmacksrezeptorzellen darstellen.

Die Einführung des stationären, fluoreszierenden Markerproteins hrGFP im *Tas1r1*-Locus ermöglichte weiterhin die Analyse der Expression der Umami-Rezeptoruntereinheit basierend auf dem Fluoreszenzprotein. Um eine Aussage über die Anzahl und Verteilung von Tas1r1-Rezeptorzellen auf der Zungenoberfläche zu treffen, wurde Zungenepithel von homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Tieren isoliert und ausgewertet. Hierbei ergab sich, dass die Maus im Mittel 83 ± 8 Pilzpapillen auf der Zunge hat. Die ermittelte Anzahl stimmt sehr gut mit Daten überein,

die meine Kollegin Dr. Anja Voigt in ihrer Dissertation erhoben hat. Sie konnte in einem anderen genetisch veränderten Mausmodell, dessen Modifikation ebenfalls den *Tas1r1*-Locus betraf, 84 ± 7 Geschmacksknospen in den Pilzpapillen nachweisen. Die Anzahl der ermittelten Pilzpapillen fiel jedoch damit geringer aus, als von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Zaidi und Whitehead berichteten 2006 von 104 ± 7 Geschmacksknospen in den Pilzpapillen von C57BL/6-Tieren (Zaidi & Whitehead, 2006), während Zhang und Kollegen/innen sogar von 128 ± 1 Pilzpapillen auf der Zunge identifizierten (Zhang *et al.*, 2008). Die Übereinstimmung der Daten zweier Mausmodelle aus unserer Arbeitsgruppe und die Abweichung gegenüber publizierten Daten mag durch die technische Umsetzung der Auszählung begründet sein. Während in dieser Arbeit die Auszählung auf enzymatisch isoliertem Zungenepithel beruhte, erfolgte die Bestimmung der Geschmacksknospen in den anderen Arbeiten durch Auszählungen von Kryoschnitten. Im Zuge der Arbeit von Dr. Anja Voigt wurden Gewebeschnitte von $80 \mu\text{m}$ Dicke und in den Arbeiten von Zaidi und Whitehead bzw. Zhang von $20 \mu\text{m}$ bzw. $10 \mu\text{m}$ verwendet. Da der Durchmesser einer Knospe $30 \mu\text{m}$ bis $50 \mu\text{m}$ beträgt (Speckmann *et al.*, 2008), könnten in den dünnen Gewebepreparaten einzelne Geschmacksknospen mehrfach erfasst worden sein und die höhere Anzahl an Geschmacksknospen der anderen Arbeitsgruppen erklären. Weiterhin könnten die beobachteten Diskrepanzen auch durch unterschiedliche Mausstämme bedingt sein. Die hier verwendete Mauslinie wies keinen reinen C57BL/6-Hintergrund auf, sondern war ein Hybrid von C57BL/6 und 129/Sv. Für den Mausstamm C57BL/6 konnte eine signifikant geringere Anzahl an Geschmacksknospen in der Wallpapille im Vergleich zum SWR/J-Mausstamm ermittelt werden (Miller & Whitney, 1989). Ob derartige Speziesunterschiede auch für die Pilz- oder andere Geschmackspapillen sowie andere Mauslinien zutreffen, ist nach derzeitiger Datenlage nicht bekannt.

Von den hier ermittelten 83 ± 8 Geschmacksknospen der Pilzpapillen wiesen 27 ± 1 eine hrGFP-Fluoreszenz auf. Diese waren zum überwiegenden Teil in der Zungenspitze lokalisiert. Der Anteil an positiven hrGFP-fluoreszierenden Geschmacksknospen an der Gesamtzahl der Pilzpapillen fiel mit 32 % jedoch sehr gering aus. Studien an Gewebeschnitten von Dr. Anja Voigt zeigten, dass etwa 90 % aller Pilzpapillen die Umami-Rezeptoruntereinheit *Tas1r1* exprimieren (persönliche Mitteilung). Diese große Diskrepanz ist höchstwahrscheinlich dem zu Grunde liegenden Verfahren geschuldet, da bei der Isolation des Zungenepithels nicht alle Geschmacksknospen bei der Trennung von Epithel und Muskelgewebe in Epithel verbleiben und damit als hrGFP-negativ gewertet werden. Auch bedingt die Bildakquisition am automatischen Fluoreszenz-Mikroskop eine längere Exposition mit Licht, die die Abschwächung der hrGFP-Fluoreszenz zur Folge hat. Folglich könnten schwache Fluoreszenzen einzelner Geschmacksrezeptorzellen während Digitalisierung vollständig verblasst und damit nicht erfasst worden sein. Die Anzahl hrGFP-positiver Zellen, die mit diesem Verfahren ermittelt wurde, wird daher als unterrepräsentiert eingeschätzt. Dies wurde auch durch die Analysen von Gewebeschnitten der Zungenspitze bestätigt, da mittels Konfokalmikroskopie in mindestens jeder zweiten Pilzpapille eine hrGFP-Fluoreszenz festgestellt werden konnte. Eine erneute, genauere Kalkulation hrGFP-positiver Zellen wird daher mittels Analyse von Gewebeschnitten favorisiert und empfohlen.

Die Intensität der Fluoreszenz könnte dabei auch durch das integrierte cDNA-Konstrukt selbst beeinflusst sein, da die Expressionshäufigkeit bei cDNA-Konstrukten zumeist deutlich geringer ist, als die Integration von genomischen Sequenzen mit Introns (Brinster *et al.*, 1988). Auch konnte gezeigt werden, dass Introns in cDNA-Konstrukten die Expression steigern können, ohne dass die Gewebespezifität der Expression verändert wird (Choi *et al.*, 1991; Palmiter *et al.*, 1991). In einigen Fällen kann dies durch die Präsenz von Promotorelementen, *Enhancern* oder Bindungsstellen für die Transkriptionsinitiationsmaschinerie in den Intronsequenzen erklärt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung der transkribierten RNA und ihr Export aus dem Kern Unterschieden in Abhängigkeit der An- und Abwesenheit von Introns unterliegt (Sharp, 1987; Zeitlin *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1991). Diese Varianzen lassen sich unter anderem durch eine reduzierte Nukleasezugänglichkeit und einem effizienteren Transport ins Cytoplasma begründen (Korb *et al.*, 1993; Le Hir *et al.*, 2001, 2003; Moore & Proudfoot, 2009). Eine generelle Erklärung für diesen Effekt gibt es jedoch nicht, da nicht alle intronischen Sequenzen zu einer Intron-bedingten Expressionssteigerung führen (Hentschel & Birnstiel, 1981; Lengyel, 1982; Hunt & Morimoto, 1985).

Die Betrachtung der Expression der Rezeptoren in den verschiedenen Zungenarealen machte ferner deutlich, dass die Expression von Geschmacksrezeptoren topographischen Unterschieden unterliegt. So misslang der Nachweis von hrGFP in Gewebeschnitten der Blätterpapille von drei homozygoten *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Nachkommen. Auch in den Gewebeschnitten zweier Wallpapillen konnte jeweils nur eine hrGFP-positive Zelle nachgewiesen werden. Das Opsin *sws* in der *Tas2r114^{Opsin sws}*-Linie war hingegen nur in 8 % der Pilzpapillen detektierbar, während in fast jeder fünften Geschmacksknospe der Wallpapille eine *Opsin-sws*-Expression nachweisbar war. Dies deckt sich mit Daten anderer Arbeitsgruppen, die basierend auf *In-situ*-Hybridisierung ermittelt wurden (Adler *et al.*, 2000; Hoon *et al.*, 1999; Kitagawa *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003).

Bei keiner der Mauslinien waren bedingt durch den *Knockout* eines Geschmacksrezeptors offensichtliche Beeinträchtigungen festzustellen. Die Tiere waren in Übereinstimmung mit den beschriebenen Geschmacksrezeptor-*Knockout*-Mäusen von Zhao, Mueller, Damak und Iwatsuki und Kollegen/innen (Zhao *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2005; Damak *et al.*, 2003; Iwatsuki *et al.*, 2010; Cartoni *et al.*, 2010) lebensfähig und fertil.

5.2.2.4 Nachweis der Funktionalität des IRES-Elementes

Die Erweiterung des *Targeting*-Vektors *Tas1r1^{Rho}* um hrGFP erlaubte die Visualisierung der manipulierten *Tas1r1*-Zellen. Hierfür war der Einsatz eines IRES-Elementes notwendig, welches zwischen die kodierende Region des *Rho* und des stationären Markerproteins hrGFP integriert wurde. IRES ermöglicht die Transkription beider kodierender Sequenzen unter der Kontrolle desselben Promotors. Durch die spezifische Sekundärstruktur des IRES-Elementes ergibt sich eine zweite Ribosomenbindungsstelle, die die Translation der mRNA in zwei eigenständige Proteine erlaubt (Houdebine & Attal, 1999; Mountford & Smith, 1995). Während hrGFP das gesamte Cytoplasma gleichmäßig ausfüllen sollte, müsste *Rho* vorrangig in Nähe bzw. in der Plasmamembran lokalisiert sein. Tatsächlich füllte die Fluoreszenz von hrGFP zumeist größere

Flächen aus, als die Antikörperdetektion von Rho. Je nach Schnittebene war hrGFP auch in Zellkernen detektierbar. Dies könnte durch die geringe Größe des Fluoreszenzproteins hervorgerufen worden sein, die möglicherweise einen Transport zurück in den Kern erlaubt. Rho war hingegen stets cytoplasmatisch und in Membrannähe lokalisiert. Der Nachweis beider Proteine bestätigte die Funktionalität des IRES-Elementes.

5.2.3 Funktionelle Charakterisierung und Konsequenzen der Manipulation eines Geschmacksrezeptorlocus im genetisch veränderten Mausmodell

5.2.3.1 Funktionelle Konsequenzen des Opsin-*Knockins*

Die Wahrnehmung von optischen Reizen wie Wellenlänge und Intensität erfolgt über das absorbierende System der Netzhaut im Auge. Die Expression von Photorezeptoren des Auges unter Kontrolle von Geschmacksrezeptorpromotoren im genetisch veränderten Mausmodell sollte der Generierung eines lichtempfindlichen Geschmackssystems dienen, welches unter Ausschluss geschmacksstoffassoziierter Stimuli durch Licht definierter Wellenlänge aktiviert werden kann.

Die Funktionalität eines solchen lichtsensitiven Geschmackssystems setzte die Überwindung dreier Hürden voraus: 1. eine ausreichende Expression, Prozessierung und erfolgreiche Integration des Opsinproteins in die Plasmamembran, 2. eine hinreichende Versorgung des Gewebes mit 11-*cis*-Retinal, um das Apoprotein Opsin in ein lichtsensitives Holoprotein umzuwandeln und 3. die funktionelle Interaktion des G-Proteins Gustducin mit den Photorezeptoren.

In den bisher getätigten Analysen der *Knockout-Knockin*-Mäuse könnte für alle drei Modelle eine Expression der Opsine in Geschmacksknospen der Zunge auf RNA- und/oder Proteinebene nachgewiesen werden (vgl. Tab. 4.11 bis 4.13; Abb. 4.27, 4.29, 4.32 bis 4.33).

Weiterhin erhalten die Mäuse eine Diät mit erhöhtem Vitamin-A-Gehalt, um eine ausreichende Versorgung mit Retinal – auch außerhalb des Auges – zu gewährleisten (vgl. 3.5.1). Dass eine ausreichende Versorgung von Opsinen mit Retinal im genetisch veränderten Mausmodell über die Diät ohne exogene Gabe von Retinal möglich ist, wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben (Bi *et al.*, 2006; Airan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). Auch konnte die Kopplung von Opsinen mit Gustducin bereits von mir im In-vitro-Modell belegt werden (vgl. 4.2.1 und 4.2.2). Folglich sehen wir alle Voraussetzungen erfüllt, um die Lichtsensitivität der Opsine im gustatorischen Gewebe zu beobachten. Die Erbringung eines Beleges für die Lichtempfindlichkeit des Geschmackssystem, die Analyse gegenüber welchen Wellenlängen diese Sensitivität besteht, sowie die Identifizierung der optimalen Stimulationsbedingungen wird Gegenstand zukünftiger Experimente sein.

5.2.3.2 Funktionelle Konsequenzen des Geschmacksrezeptor-*Knockouts*

Die Integration der Opsine in das Genom der Mäuse bedeutet gleichzeitig auch den *Knockout* eines für eine Geschmacksmodalität spezifischen Geschmacksrezeptors.

Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass der *Knockout* eines Geschmacksrezeptors ausschließlich die Nervenaktivitäten der jeweilige Geschmacksmodalität beeinflusste, die der eliminierte Geschmacksrezeptor ursprünglich vermittelte (Zhao *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Damak *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2005). Demgegenüber wiesen *Knockout*-Tiere für die Signalkaskadenproteine Gustducin, PLC und TrpM5 starke Beeinträchtigungen in der Wahrnehmung der Geschmacksmodalitäten umami, süß und bitter auf (Wong *et al.*, 1996; Ruiz *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Damak *et al.*, 2006; Mueller *et al.*, 2005; Dotson *et al.*, 2005; Danilova *et al.*, 2006).

Die Beeinträchtigungen, die mit dem Geschmacksrezeptor-*Knockout* der hier generierten Mausmodelle einhergehen, sollen nachfolgend in Verhaltenstests und elektrophysiologischen Messungen evaluiert werden.

Bereits zuvor erhobene Daten von *Tas1r1-Knockout*-Tieren, die durch Eliminierung der heptahelikalen Region erzeugt wurden, zeigten bei Verlust des *Tas1r1*-Rezeptors einen vollständigen Verlust der Aktivität des *Chorda-tympani*-Nervs gegenüber einzelnen Aminosäuren (Zhao *et al.*, 2003). Vergleichbare Befunde wurden für den *Knockout* der zweiten Umami-Rezeptoruntereinheit *Tas1r3* von Zhao beschrieben (Zhao *et al.*, 2003). Demgegenüber beobachtete Damak in den von ihm generierten *Tas1r3-Knockout*-Tieren nur ein vermindertes attraktives Verhalten und eine reduzierte Nervenantwort für MSG im *Two-bottle preference*-Verhaltenstest bzw. in Nervenableitungen des *Chorda-tympani*-Nervs (Damak *et al.*, 2003). Die Nervenantworten des *Nervus glossopharyngeus* waren hingegen nahezu unverändert (Damak *et al.*, 2003). Weist das *Tas1r1^{Rho-IRE5-hrGFP}*-Modell, welches wie die *Tas1r3-Knockout*-Maus von Damak über die komplette Entfernung der kodierenden Region generiert wurde, ebenfalls Abweichungen zu den Daten von Zhao auf?

Wäre das der Fall, wäre dies ein weiterer Beleg, dass neben dem Heterodimer *Tas1r1/Tas1r3* weitere Proteine in der Wahrnehmung des Umamigeschmacks insbesondere in Wall- und Blätterpapille(n) involviert sind.

Diskutiert werden in diesem Zusammenhang der metabotropische Glutamatrezeptor mGluR1 (San Gabriel *et al.*, 2007; Toyono *et al.*, 2003) und mGluR4 (Chaudhari *et al.*, 2000) und die kürzeren Varianten von mGluR1 und mGluR4, deren verkürzter N-Terminus Glutamat mit herabgesetzter Sensitivität binden kann (San Gabriel *et al.*, 2005; Chaudhari *et al.*, 1996, 2000). Aber auch mGluR2 und mGluR3 sowie die ionotropen Glutamatrezeptoren NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) und der Kainatrezeptor könnten zur Detektion des Umamigeschmacks beitragen (Toyono *et al.*, 2007; Brand, 2000).

Mit dem *Tas1r2^{Opsin mws}*-Mausmodell soll hingegen die Relevanz des *Tas1r2*-Rezeptors auf die Detektion verschiedener Süßstoffe evaluiert werden. Die süßrezeptorspezifische Untereinheit *Tas1r2* ist auf der Zunge überwiegend in Geschmacksknospen der Wall- und Blätterpapille(n) lokalisiert und nur selten in Geschmacksknospen der Pilzpapillen gefunden worden (Hoon *et al.*,

1999). Tas1r2 ist dabei stets mit Tas1r3 koexprimiert, während Tas1r3 auch allein in Geschmacksrezeptorzellen vorliegt. Daher wurde vermutet, dass Tas1r3 auch als Monomer oder Homodimer funktionell agieren kann (Zhao *et al.*, 2003; Damak *et al.*, 2003). *In-vitro*-Analysen bestätigten diese These, jedoch sind für die Aktivierung des Homodimers hohe Konzentrationen an Süßstoffen vonnöten (Nie *et al.*, 2005). Die Tas1r3-Sequenz ist dabei nachweislich für die variierende Präferenz zahlreicher Süßstoffe zwischen den Mausstämmen C57BL/6 und 129 verantwortlich (Inoue *et al.*, 2007). Detaillierte Erkenntnisse über die Bindungsstellen einzelner Süßstoffe an die Süß-Rezeptoruntereinheiten Tas1r2 und Tas1r3 der Maus sind jedoch nicht bekannt. Basierend auf der Beobachtung, dass Tas1r2/Tas1r3-Doppel-*Knockout*-Tiere keine Nervenantworten bei Applikation hoch konzentrierter Mono- und Disaccharidlösungen aufweisen, wurde geschlossen, dass einzig Tas1rs Süßstoffe erkennen und deren Anwesenheit vermitteln (Zhao *et al.*, 2003).

Neben den Tas1rs konnten kürzlich im gustatorischen Gewebe auch Mitglieder der GLUT- (Glucosetransporter) und der SGLT-Familie (*sodium-glucose linked transporter*, Na⁺/Glucose-Kotransporter) sowie SUR1 (*sulfonylurea receptor 1*) und Kir (*inwardly rectifying potassium channel*) nachgewiesen werden (Yee *et al.*, 2011; Toyono *et al.*, 2011). Erste präzisere Expressionsanalysen der Glucosetransporter lassen vermuten, dass GLUT1, GLUT4, SGLT1 und SUR1 in Geschmacksrezeptorzellen exprimiert sind (Yee *et al.*, 2011; Toyono *et al.*, 2011). Zukünftige, detaillierte Untersuchungen müssen die genauen Funktionen dieser Rezeptoren und Kanäle in den Geschmacksrezeptorzellen und deren Involvierung in der Wahrnehmung von Süßstoffen ermitteln.

Rezeptoren und Kanäle wie diese könnten eventuell an der Wahrnehmung des Polysaccharids Polycose beteiligt sein, welches unabhängig vom Heterodimer Tas1r2/Tas1r3 detektiert werden soll (Treesukosol *et al.*, 2009, 2011; Zukerman *et al.*, 2008; Nissenbaum & Sclafani, 1987; Sako *et al.*, 1994; Sclafani, 1987, 2004).

Während die kodierenden Regionen von Tas1r1 und Tas1r2 auf Chromosom vier relativ weit voneinander entfernt liegen, ist der überwiegende Anteil der Bitterrezeptoren in unmittelbarer Nähe zueinander in zwei Clustern auf Chromosom sechs lokalisiert. Könnte auf Grund dieser Nähe der *Knockout* eines der Bitterrezeptoren die Expression seiner Nachbarn verändern?

Der im Zuge dieser Arbeit in einem Mausmodell eliminierte Bitterrezeptor Tas2r114 ist am distalen Ende des Chromosoms sechs am Ende eines Bitterrezeptorclusters gelegen. Unmittelbar benachbart zur kodierenden Region des Tas2r114-Rezeptors ist die Sequenz des Bitterrezeptors Tas2r105. War durch das Ereignis der homologen Rekombination die nicht-kodierende 3'-Sequenz des Tas2r114-Locus verändert und damit die 5'-gelegene Sequenz des Tas2r105 oder die Tas2r105-kodierende Sequenz selbst modifiziert? Sequenzanalysen der genomischen DNA von Nachkommen der Tas2r114-Linie zeigten, dass weder die kodierende Sequenz des Tas2r105-Rezeptors, noch der vorgelagerte Sequenzbereich bei homozygoten Tieren von Wildtyp-Mäusen abwich. Da das Stoppcodon des Tas2r114-Rezeptors nur 1672 bp von dem Startcodon des Tas2r105-Rezeptors entfernt liegt, konnte entsprechend der Sequenzanalysen jedoch nicht ausgeschlossen werden, ob die kodierende Region des

Tas2r114-Rezeptors Teil des Tas2r105-Promotors oder Bindungsstelle für regulatorische Elemente der Transkription ist.

In-situ-Analysen für den Bitterrezeptor Tas2r105 von Tas2r114-Nachkommen zeigten, dass nur etwa halb so viele Tas2r105-exprimierende Zellen in Blätter- und Wallpapille(n) von homozygoten Nachkommen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren nachweisbar waren (vgl. Abb. 8.6). Quantitative Analysen meiner Kollegin Sandra Hübner (DIfE, persönliche Mitteilung) mittels *Real-Time*-PCR von isoliertem Zungenepithel der Wall- und Blätterpapille von je drei Mäusen beider Genotypen dieser Linie verdeutlichten, dass die Expression von Tas2r105 in homozygoten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen um etwa ein Drittel reduziert war. Die *Expressionslevel* der Bitterrezeptoren Tasr102, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r120, Tas2r131 und Tas2r138 sowie des G-Protein Gustducins, die nicht unmittelbar in der Nähe des *Tas2r114*-Locus lokalisiert sind, waren hingegen unbeeinträchtigt und wiesen keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen auf.

Auf Grund der Sequenz- und quantitativen Expressionsanalysen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Sequenz des Tas2r114-Rezeptors Teil des Tas2r105-Promotors ist und/oder regulatorische Bindungsstellen für den Rezeptor enthält.

Auch muss im weiteren Verlauf der Charakterisierung der *Tas2r114^{Opsin sws}*-Tiere die Expression von Tas2r104 genauer betrachtet werden, da die kodierende Region dieses Rezeptors unmittelbar dem *Tas2r105*- und *Tas2r114*-Locus folgt und damit auch dessen Promotorbereich und Expression durch die Manipulation des *Tas2r114*-Locus beeinträchtigt sein könnte.

Auf Grund jener Beobachtungen ist in den funktionellen Analysen nicht nur mit einer Beeinträchtigung bei der Wahrnehmung von Liganden des Bitterrezeptors Tas2r114, sondern auch eine reduzierte Wahrnehmung von Bitterstoffen, die über Tas2r105 vermittelt werden, zu erwarten. Entsprechend der zuvor von Mueller und Kollegen/innen erhobenen Daten von *Tas2r105-Knockout*-Mäusen ist dabei mit einer herabgesetzten Sensitivität gegenüber Cycloheximid zu rechnen (Mueller *et al.*, 2005). Beeinträchtigungen gegenüber weiteren Bitterstoffen wurden in den von ihnen durchgeführten Verhaltensexperimenten jedoch nicht beobachtet. Führt die starke Reduktion der Tas2r105-Expression, trotz eines umfangreichen Aktivierungsspektrum (vgl. Abb. 4.5), wirklich nur zur einer Veränderung in der Detektion von Cycloheximid?

Im visuellen System führt die Zerstörung der kodierenden Opsin-sws-Region zu einer Steigerung der Opsin-mws-Expression (Daniele *et al.*, 2011). Gibt es eine solche Gegenregulation auch bei Bittergeschmacksrezeptoren? Generell ist sehr wenig über die Regulation der Expression von Geschmacksrezeptoren bekannt. Einzig für den Bitterrezeptor Tas2r138 konnte eine SREBP-2-abhängige Transkription beobachtet werden (Jeon *et al.*, 2008). Die SREBP-Aktivität steht dabei in einem direkten, negativ korrelierten Verhältnis zu Cholesterol. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Pflanzen einen hohen Gehalt an Bitterstoffen und Toxinen aufweisen, jedoch arm an Cholesterol sind, würde dies gut zur Annahme passen, dass der Körper seine Sensitivität gegenüber Bitterstoffen bei erhöhtem Konsum von pflanzlichem Material steigern kann.

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass für alle modifizierten ES-Zellen fertile Chimäre gewonnen werden konnten, die Grundlage für die Generierung der stabiler Mauslinien waren. Allen drei erzeugten Linien war die Entfernung der Selektionskassette gemein, die unerwartete Nebeneffekte auf Grund eines zusätzlichen Promotors hätte bedeuten können. Expressionsstudien per RT-PCR, *In-situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie belegten die erfolgreiche Integration der Opsine in das Genom der Mäuse, die mit dem Verlust jeweils eines Geschmacksrezeptors einher ging. Die Lichtsensitivität der Geschmacksrezeptorzellen sowie die Beeinträchtigungen der Geschmackswahrnehmung durch den Rezeptor-*Knockout* werden in nachfolgenden Analysen umfassend untersucht.

Hierfür sind die Erfassung von Ableitungen gustatorischer Nerven bei Applikation von Geschmacks- und Lichtstimuli sowie *Calcium-Imaging*-Experimente mit Geschmacksknospenzellen der genetisch veränderten Mausmodelle geplant. Ergänzt werden sollen diese Analysen durch Verhaltenstest. Mit ihnen soll überprüft werden, ob bspw. die Belichtung der Zunge und der Mundhöhle der homozygoten Tas2r114^{Opsin sws}-Maus mit UV-Licht vergleichbare Verhaltensweisen bedingt, wie sie bei der Aufnahme von Bitterstoffen beschrieben wurden (Grill & Norgren, 1978; Travers *et al.*, 2007). Ist dies der Fall, sollte die Stimulation mit Licht die Expression von *immediate early genes* auslösen, die in gustatorischen Hirnarealen visualisiert werden können (Harrer & Travers, 1996; Guzowski *et al.*, 2001; Tzingounis & Nicoll, 2006; Montag-Sallaz & Montag, 2003).

Sollte in diesen Experimenten die Funktionalität der Opsine im gustatorischen System bestätigt werden, wären im Verlauf dieser Doktorarbeit Mausmodelle generiert worden, die es ermöglichen würden gustatorische, neuronale Netzwerke und Hirnareale zu identifizieren, die auf einen reinen geschmacks- und qualitätsspezifischen Stimulus zurückzuführen wären.

Weiterhin soll im Zuge der Verhaltensexperimente mittels Kurzzeit-Präferenz-Tests am Lickometer der Einfluss des Geschmacksrezeptor-*Knockouts* – insbesondere für Tas2r114 – auf die Geschmackswahrnehmung überprüft werden. Die zuvor erhobenen *In-vitro*-Daten zur Aktivierung von Bitterrezeptoren der Maus werden die Interpretationen der elektrophysiologischen Messungen und Verhaltenstests erleichtern und bilden damit eine wesentliche Grundlage für die Planung und Auswertung nachfolgender Analysen.

6 Zusammenfassung

Die Wahrnehmung von Geschmacksempfindungen beruht auf dem Zusammenspiel verschiedener Sinneseindrücke wie Schmecken, Riechen und Tasten. Diese Komplexität der gustatorischen Wahrnehmung erschwert die Beantwortung der Frage wie Geschmacksinformationen vom Mund ins Gehirn weitergeleitet, prozessiert und kodiert werden.

Die Analysen zur neuronalen Prozessierung von Geschmacksinformationen erfolgten zumeist mit Bitterstimuli am Mausmodell. Zwar ist bekannt, dass das Genom der Maus für 35 funktionelle Bitterrezeptoren kodiert, jedoch war nur für zwei unter ihnen ein Ligand ermittelt worden. Um eine bessere Grundlage für tierexperimentelle Arbeiten zu schaffen, wurden 16 der 35 Bitterrezeptoren der Maus heterolog in HEK293T-Zellen exprimiert und in *Calcium-Imaging*-Experimenten funktionell charakterisiert. Die Daten belegen, dass das Funktionsspektrum der Bitterrezeptoren der Maus im Vergleich zum Menschen enger ist und widerlegen damit die Aussage, dass humane und murine, orthologe Rezeptoren durch das gleiche Ligandenspektrum angesprochen werden. Die Interpretation von tierexperimentellen Daten und die Übertragbarkeit auf den Menschen werden folglich nicht nur durch die Komplexität des Geschmacks, sondern auch durch Speziesunterschiede erschwert.

Die Komplexität des Geschmacks beruht u. a. auf der Tatsache, dass Geschmacksstoffe selten isoliert auftreten und daher eine Vielzahl an Informationen kodiert werden muss. Um solche geschmacksstoffassoziierten Stimuli in der Analyse der gustatorischen Kommunikationsbahnen auszuschließen, sollten Opsine, die durch Licht spezifischer Wellenlänge angeregt werden können, für die selektive Ersetzung von Geschmacksrezeptoren genutzt werden.

Um die Funktionalität dieser angestrebten *Knockout-Knockin*-Modelle zu evaluieren, die eine Kopplung von Opsinen mit dem geschmacksspezifischen G-Protein Gustducin voraussetzte, wurden Oozyten vom Krallenfrosch *Xenopus laevis* mit dem Zwei-Elektroden-Spannungsklemm-Verfahren hinsichtlich dieser Interaktion analysiert.

Der positiven Bewertung dieser Kopplung folgte die Erzeugung von drei Mauslinien, die in der kodierenden Region eines spezifischen Geschmacksrezeptors (*Tas1r1*, *Tas1r2*, *Tas2r114*) für einen Photorezeptoren kodierten. Durch RT-PCR-, *In-situ*-Hybridisierungs- und immunhistochemische Experimente konnte der erfolgreiche *Knockout* der Rezeptorgene und der *Knockin* der Opsine belegt werden.

Der Nachweis der Funktionalität der Opsine im gustatorischen System wird Gegenstand zukünftiger Analysen sein. Bei erfolgreichem Beleg der Lichtempfindlichkeit von Geschmacksrezeptorzellen dieser Mausmodelle wäre ein System geschaffen, das es ermöglichen würde gustatorische, neuronale Netzwerke und Hirnareale zu identifizieren, die auf einen reinen geschmacks- und qualitätsspezifischen Stimulus zurückzuführen wären.

7 Literaturverzeichnis

- Accolla R, Bathellier B, Petersen CC, Carleton A (2007) Differential spatial representation of taste modalities in the rat gustatory cortex. *J Neurosci* 27:1396-1404.
- Adler E, Hoon MA, Mueller KL, Chandrashekar J, Ryba NJ, Zuker CS (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100:693-702.
- Airan RD, Thompson KR, Fenno LE, Bernstein H, Deisseroth K (2009) Temporally precise in vivo control of intracellular signalling. *Nature* 458:1025-1029.
- Allen AE, Cameron MA, Brown TM, Vugler AA, Lucas RJ (2010) Visual responses in mice lacking critical components of all known retinal phototransduction cascades. *PLoS One* 5:e15063.
- Allen GV, Saper CB, Hurley KM, Cechetto DF (1991) Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat. *J Comp Neurol* 311:1-16.
- Ammon C, Schafer J, Kreuzer OJ, Meyerhof W (2002) Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem* 110:137-145.
- Andres-Barquin PJ, Conte C (2004) Molecular basis of bitter taste: the T2R family of G protein-coupled receptors. *Cell Biochem Biophys* 41:99-112.
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT (2000) The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27:513-523.
- Araki K, Imaizumi T, Okuyama K, Oike Y, Yamamura K (1997) Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem* 122:977-982.
- Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2002) G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* 64:153-187.
- Bachmanov AA, Reed DR, Tordoff MG, Price RA, Beauchamp GK (1996) Intake of ethanol, sodium chloride, sucrose, citric acid, and quinine hydrochloride solutions by mice: a genetic analysis. *Behav Genet* 26:563-573.
- Bachmanov AA, Li X, Reed DR, Ohmen JD, Li S, Chen Z, Tordoff MG, de Jong PJ, Wu C, West DB, Chatterjee A, Ross DA, Beauchamp GK (2001) Positional cloning of the mouse saccharin preference (Sac) locus. *Chem Senses* 26:925-933.
- Baker EK, Colley NJ, Zuker CS (1994) The cyclophilin homolog NinaA functions as a chaperone, forming a stable complex in vivo with its protein target rhodopsin. *Embo J* 13:4886-4895.
- Barratt-Fornell A, Drewnowski A (2002) The Taste of Health: Nature's Bitter Gifts. *Nutr Today* 37:144-150.
- Bartel DL, Sullivan SL, Lavoie EG, Sevigny J, Finger TE (2006) Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol* 497:1-12.
- Bartoshuk LM, Rennert K, Rodin J, Stevens JC (1982) Effects of temperature on the perceived sweetness of sucrose. *Physiol Behav* 28:905-910.
- Baylor DA (1987) Photoreceptor signals and vision. Proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:34-49.
- Behrens M, Meyerhof W (2006) Bitter taste receptors and human bitter taste perception. *Cell Mol Life Sci* 63:1501-1509.
- Behrens M, Brockhoff A, Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Meyerhof W (2004) The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun* 319:479-485.
- Behrens M, Brockhoff A, Batram C, Kuhn C, Appendino G, Meyerhof W (2009) The human bitter taste receptor hTAS2R50 is activated by the two natural bitter terpenoids andrographolide and amarogentin. *J Agric Food Chem* 57:9860-9866.
- Beidler LM, Smallman RL (1965) Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol* 27:263-272.

- Belecky TL, Smith DV (1990) Postnatal development of palatal and laryngeal taste buds in the hamster. *J Comp Neurol* 293:646-654.
- Belitz HD, Wieser H (1985) Bitter compounds: Occurrence and structure-activity relationship. *Food Reviews International* 1:271-354.
- Berridge MJ (1989) Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced calcium mobilization is localized in *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 238:235-243.
- Berthold P, Tsunoda SP, Ernst OP, Mages W, Gradmann D, Hegemann P (2008) Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization. *Plant Cell* 20:1665-1677.
- Bezencon C, le Coutre J, Damak S (2007) Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells. *Chem Senses* 32:41-49.
- Bi A, Cui J, Ma YP, Olshevskaya E, Pu M, Dizhoor AM, Pan ZH (2006) Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50:23-33.
- Biere A, Marak HB, van Damme JM (2004) Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia* 140:430-441.
- Blackshaw S, Snyder SH (1997) Developmental expression pattern of phototransduction components in mammalian pineal implies a light-sensing function. *J Neurosci* 17:8074-8082.
- Blackshaw S, Snyder SH (1999) Encephalopsin: a novel mammalian extraretinal opsin discretely localized in the brain. *J Neurosci* 19:3681-3690.
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18:1723-1729.
- Boquet P, Silverman MS, Pappenheimer AM, Jr. (1977) Interaction of diphtheria toxin with mammalian cell membranes. *Prog Clin Biol Res* 17:501-509.
- Bossi E, Fabbri MS, Ceriotti A (2007) Exogenous protein expression in *Xenopus* oocytes: basic procedures. *Methods Mol Biol* 375:107-131.
- Boughter JD, Jr., Whitney G (1997) Behavioral specificity of the bitter taste gene *Soa*. *Physiol Behav* 63:101-108.
- Boughter JD, Jr., Smith DV (1998) Amiloride blocks acid responses in NaCl-best gustatory neurons of the hamster solitary nucleus. *J Neurophysiol* 80:1362-1372.
- Boughter JD, Jr., St John SJ, Smith DV (1999) Neural representation of the taste of NaCl and KCl in gustatory neurons of the hamster solitary nucleus. *J Neurophysiol* 81:2636-2646.
- Boughter JD, Jr., Harder DB, Capeless CG, Whitney G (1992) Polygenic determination of quinine sensitivity among mice. *Chem Senses* 17:427-434.
- Boughter JD, Jr., Pumplin DW, Yu C, Christy RC, Smith DV (1997) Differential expression of alpha-gustducin in taste bud populations of the rat and hamster. *J Neurosci* 17:2852-2858.
- Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci* 8:1263-1268.
- Brand JG (2000) Receptor and transduction processes for umami taste. *J Nutr* 130:942S-945S.
- Breza JM, Curtis KS, Contreras RJ (2006) Temperature modulates taste responsiveness and stimulates gustatory neurons in the rat geniculate ganglion. *J Neurophysiol* 95:674-685.
- Brinster RL, Sandgren EP, Behringer RR, Palmiter RD (1989) No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 59:239-241.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter RD (1985) Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:4438-4442.
- Briscoe CP et al. (2003) The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 278:11303-11311.

- Brockhoff A, Behrens M, Massarotti A, Appendino G, Meyerhof W (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* 55:6236-6243.
- Buck LB (2000) The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals. *Cell* 100:611-618.
- Bufe B, Hofmann T, Krautwurst D, Raguse JD, Meyerhof W (2002) The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet* 32:397-401.
- Bufe B, Breslin PA, Kuhn C, Reed DR, Tharp CD, Slack JP, Kim UK, Drayna D, Meyerhof W (2005) The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol* 15:322-327.
- Bunting M, Bernstein KE, Greer JM, Capecchi MR, Thomas KR (1999) Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes Dev* 13:1524-1528.
- Callaway EM (2005) A molecular and genetic arsenal for systems neuroscience. *Trends Neurosci* 28:196-201.
- Callaway EM, Yuste R (2002) Stimulating neurons with light. *Curr Opin Neurobiol* 12:587-592.
- Cao Y, Zhao FL, Kolli T, Hivley R, Herness S (2009) GABA expression in the mammalian taste bud functions as a route of inhibitory cell-to-cell communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4006-4011.
- Capeless CG, Whitney G, Azen EA (1992) Chromosome mapping of *Soa*, a gene influencing gustatory sensitivity to sucrose octaacetate in mice. *Behav Genet* 22:655-663.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 188:245-262.
- Cartoni C, Yasumatsu K, Ohkuri T, Shigemura N, Yoshida R, Godinot N, le Coutre J, Ninomiya Y, Damak S (2010) Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120. *J Neurosci* 30:8376-8382.
- Chandrashekar J, Hoon MA, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The receptors and cells for mammalian taste. *Nature* 444:288-294.
- Chandrashekar J, Kuhn C, Oka Y, Yarmolinsky DA, Hummler E, Ryba NJ, Zuker CS (2010) The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 464:297-301.
- Chandrashekar J, Mueller KL, Hoon MA, Adler E, Feng L, Guo W, Zuker CS, Ryba NJ (2000) T2Rs function as bitter taste receptors. In: *Cell*, 2000/04/13 Edition, pp 703-711.
- Chang RB, Waters H, Liman ER (2010) A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:22320-22325.
- Chaudhari N, Landin AM, Roper SD (2000) A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nat Neurosci* 3:113-119.
- Chaudhari N, Yang H, Lamp C, Delay E, Cartford C, Than T, Roper S (1996) The taste of monosodium glutamate: membrane receptors in taste buds. *J Neurosci* 16:3817-3826.
- Chen CK, Woodruff ML, Chen FS, Shim H, Cilluffo MC, Fain GL (2010) Replacing the rod with the cone transducin subunit decreases sensitivity and accelerates response decay. *J Physiol* 588:3231-3241.
- Chen P, Zhang W, Zhou Z, Chen C, Hu J, Wang P (2011) A serotonin-sensitive sensor for investigation of taste cell-to-cell communication. *Biosens Bioelectron* 26:3054-3058.
- Chiu MI, Zack DJ, Wang Y, Nathans J (1994) Murine and bovine blue cone pigment genes: cloning and characterization of two new members of the S family of visual pigments. *Genomics* 21:440-443.
- Choi T, Huang M, Gorman C, Jaenisch R (1991) A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 11:3070-3074.
- Clapp TR, Stone LM, Margolskee RF, Kinnamon SC (2001) Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP3 receptor with signaling components of bitter taste transduction. *BMC Neurosci* 2:6.

- Clapp TR, Yang R, Stoick CL, Kinnamon SC, Kinnamon JC (2004) Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *J Comp Neurol* 468:311-321.
- Clapp TR, Medler KF, Damak S, Margolskee RF, Kinnamon SC (2006) Mouse taste cells with G protein-coupled taste receptors lack voltage-gated calcium channels and SNAP-25. *BMC Biol* 4:7.
- Clapp TR, Trubey KR, Vandenbeuch A, Stone LM, Margolskee RF, Chaudhari N, Kinnamon SC (2008) Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsiveness. *FEBS Lett* 582:3783-3787.
- Conklin BR, Bourne HR (1993) Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell* 73:631-641.
- Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P, Andres-Barquin PJ (2002) Identification and characterization of human taste receptor genes belonging to the TAS2R family. *Cytogenet Genome Res* 98:45-53.
- Conte C, Ebeling M, Marcuz A, Nef P, Andres-Barquin PJ (2003) Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human. *Physiol Genomics* 14:73-82.
- Cruz A, Green BG (2000) Thermal stimulation of taste. *Nature* 403:889-892.
- Cuenca N, Lopez S, Howes K, Kolb H (1998) The localization of guanylyl cyclase-activating proteins in the mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1243-1250.
- Cummings DE, Overduin J (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117:13-23.
- Cummings TA, Daniels C, Kinnamon SC (1996) Sweet taste transduction in hamster: sweeteners and cyclic nucleotides depolarize taste cells by reducing a K⁺ current. *J Neurophysiol* 75:1256-1263.
- Dalva MB, Katz LC (1994) Rearrangements of synaptic connections in visual cortex revealed by laser photostimulation. *Science* 265:255-258.
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Varadarajan V, Zou S, Jiang P, Ninomiya Y, Margolskee RF (2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301:850-853.
- Damak S, Rong M, Yasumatsu K, Kokrashvili Z, Perez CA, Shigemura N, Yoshida R, Mosinger B, Jr., Glendinning JI, Ninomiya Y, Margolskee RF (2006) Trpm5 null mice respond to bitter, sweet, and umami compounds. *Chem Senses* 31:253-264.
- Dando R, Roper SD (2009) Cell-to-cell communication in intact taste buds through ATP signalling from pannexin 1 gap junction hemichannels. *J Physiol* 587:5899-5906.
- Daniele LL, Insinna C, Chance R, Wang J, Nikonov SS, Pugh EN, Jr. (2011) A mouse M-opsin monochromat: retinal cone photoreceptors have increased M-opsin expression when S-opsin is knocked out. *Vision Res* 51:447-458.
- Danilova V, Damak S, Margolskee RF, Hellekant G (2006) Taste responses to sweet stimuli in alpha-gustducin knockout and wild-type mice. *Chem Senses* 31:573-580.
- Darnall HJ, Lythgoe JN (1965) The spectral clustering of visual pigments. *Vision Res* 5:81-100.
- de Araujo IE, Kringelbach ML, Rolls ET, McGlone F (2003) Human cortical responses to water in the mouth, and the effects of thirst. *J Neurophysiol* 90:1865-1876.
- DeFazio RA, Dvoryanchikov G, Maruyama Y, Kim JW, Pereira E, Roper SD, Chaudhari N (2006) Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci* 26:3971-3980.
- Delay RJ, Kinnamon JC, Roper SD (1986) Ultrastructure of mouse vallate taste buds: II. Cell types and cell lineage. *J Comp Neurol* 253:242-252.
- Deng C, Capecchi MR (1992) Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol Cell Biol* 12:3365-3371.
- Denny M, Liu RS (1977) Sterically hindered isomers of retinal from direct irradiation of the all-trans isomer. Isolation of 7-cis-retinal 1. *J Am Chem Soc* 99:4865-4867.

- Deshpande DA, Wang WC, McIlmoyle EL, Robinett KS, Schillinger RM, An SS, Sham JS, Liggett SB (2010) Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med* 16:1299-1304.
- DeSimone JA, Lyall V, Heck GL, Feldman GM (2001) Acid detection by taste receptor cells. *Respir Physiol* 129:231-245.
- Di Lorenzo PM, Leshchinskiy S, Moroney DN, Ozdoba JM (2009) Making time count: functional evidence for temporal coding of taste sensation. *Behav Neurosci* 123:14-25.
- DiNardo LA, Travers JB (1997) Distribution of fos-like immunoreactivity in the medullary reticular formation of the rat after gustatory elicited ingestion and rejection behaviors. *J Neurosci* 17:3826-3839.
- Dong D, Jones G, Zhang S (2009) Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evol Biol* 9:12.
- Dotson CD, Roper SD, Spector AC (2005) PLCbeta2-independent behavioral avoidance of prototypical bitter-tasting ligands. *Chem Senses* 30:593-600.
- Dotson CD, Zhang L, Xu H, Shin YK, Vignes S, Ott SH, Elson AE, Choi HJ, Shaw H, Egan JM, Mitchell BD, Li X, Steinle NI, Munger SD (2008) Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One* 3:e3974.
- Drewnowski A, Gomez-Carneros C (2000) Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr* 72:1424-1435.
- Dumont JN, Brummett AR (1978) Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol* 155:73-97.
- Dvoryanchikov G, Sinclair MS, Perea-Martinez I, Wang T, Chaudhari N (2009) Inward rectifier channel, ROMK, is localized to the apical tips of glial-like cells in mouse taste buds. *J Comp Neurol* 517:spc1.
- Dvoryanchikov G, Huang YA, Barro-Soria R, Chaudhari N, Roper SD (2011) GABA, Its Receptors, and GABAergic Inhibition in Mouse Taste Buds. *J Neurosci* 31:5782-5791.
- Dwyer ND, Troemel ER, Sengupta P, Bargmann CI (1998) Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. *Cell* 93:455-466.
- Dyer J, Salmon KS, Zibrik L, Shirazi-Beechey SP (2005) Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochem Soc Trans* 33:302-305.
- Eddy MC, Eschle BK, Barrows J, Hallock RM, Finger TE, Delay ER (2009) Double P2X2/P2X3 purinergic receptor knockout mice do not taste NaCl or the artificial sweetener SC45647. *Chem Senses* 34:789-797.
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.
- Feldbauer K, Zimmermann D, Pintschovius V, Spitz J, Bamann C, Bamberg E (2009) Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12317-12322.
- Fenech C, Patrikainen L, Kerr DS, Grall S, Liu Z, Laugerette F, Malnic B, Montmayeur JP (2009) Ric-8A, a Galpha protein guanine nucleotide exchange factor potentiates taste receptor signaling. *Front Cell Neurosci* 3:11.
- Fiering S, Epner E, Robinson K, Zhuang Y, Telling A, Hu M, Martin DI, Enver T, Ley TJ, Groudine M (1995) Targeted deletion of 5'HS2 of the murine beta-globin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the beta-globin locus. *Genes Dev* 9:2203-2213.
- Finger TE, Bottger B, Hansen A, Anderson KT, Alimohammadi H, Silver WL (2003) Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8981-8986.
- Finger TE, Danilova V, Barrows J, Bartel DL, Vigers AJ, Stone L, Hellekant G, Kinnamon SC (2005) ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science* 310:1495-1499.

- Floriano WB, Hall S, Vaidehi N, Kim U, Drayna D, Goddard WA, 3rd (2006) Modeling the human PTC bitter-taste receptor interactions with bitter tastants. *J Mol Model* 12:931-941.
- Frank M (1973) An analysis of hamster afferent taste nerve response functions. *J Gen Physiol* 61:588-618.
- Frank ME, Contreras RJ, Hettinger TP (1983) Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. *J Neurophysiol* 50:941-960.
- Frank ME, Bieber SL, Smith DV (1988) The organization of taste sensibilities in hamster chorda tympani nerve fibers. *J Gen Physiol* 91:861-896.
- Frank ME, Lundy RF, Jr., Contreras RJ (2008) Cracking taste codes by tapping into sensory neuron impulse traffic. *Prog Neurobiol* 86:245-263.
- Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272.
- Fu Y, Yau KW (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch* 454:805-819.
- Gaillard D, Passilly-Degrace P, Besnard P (2008) Molecular mechanisms of fat preference and overeating. *Ann N Y Acad Sci* 1141:163-175.
- Gao N, Lu M, Echeverri F, Laita B, Kalabat D, Williams ME, Hevezi P, Zlotnik A, Moyer BD (2009) Voltage-gated sodium channels in taste bud cells. *BMC Neurosci* 10:20.
- Garcia-Bailo B, Toguri C, Eny KM, El-Sohemy A (2009) Genetic variation in taste and its influence on food selection. *OMICS* 13:69-80.
- GEO (2007) Geschmackssinn. In: Gaede P M (ed) GEO Themenlexikon; Naturwissenschaften und Technik Band 6 Gruner AG & Co KG Mannheim.
- Geran LC, Travers SP (2006) Single neurons in the nucleus of the solitary tract respond selectively to bitter taste stimuli. *J Neurophysiol* 96:2513-2527.
- Geran LC, Travers SP (2009) Bitter-responsive gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus. *J Neurophysiol* 101:1598-1612.
- Gether U, Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273:17979-17982.
- Gilbertson TA, Baquero AF, Spray-Watson KJ (2006) Water taste: the importance of osmotic sensing in the oral cavity. *J Water Health* 4 Suppl 1:35-40.
- Gillo B, Lass Y, Nadler E, Oron Y (1987) The involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate and calcium in the two-component response to acetylcholine in *Xenopus* oocytes. *J Physiol* 392:349-361.
- Glendinning JI (1994) Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiol Behav* 56:1217-1227.
- Glendinning JI, Yiin YM, Ackroff K, Sclafani A (2008) Intra-gastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents. *Physiol Behav* 93:757-765.
- Go Y (2006) Proceedings of the SMBE Tri-National Young Investigators' Workshop 2005. Lineage-specific expansions and contractions of the bitter taste receptor gene repertoire in vertebrates. *Mol Biol Evol* 23:964-972.
- Go Y, Satta Y, Takenaka O, Takahata N (2005) Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates. *Genetics* 170:313-326.
- Goc A, Angel TE, Jastrzebska B, Wang B, Wintrode PL, Palczewski K (2008) Different properties of the native and reconstituted heterotrimeric G protein transducin. *Biochemistry* 47:12409-12419.
- Gooley JJ, Lu J, Fischer D, Saper CB (2003) A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* 23:7093-7106.
- Goren-Inbar N, Alperson N, Kislev ME, Simchoni O, Melamed Y, Ben-Nun A, Werker E (2004) Evidence of hominin control of fire at Geshen Benot Ya'akov, Israel. *Science* 304:725-727.
- Green BG (1987) The effect of cooling on the vibrotactile sensitivity of the tongue. *Percept Psychophys* 42:423-430.

- Green BG, Frankmann SP (1988) The effect of cooling on the perception of carbohydrate and intensive sweeteners. *Physiol Behav* 43:515-519.
- Grill HJ, Norgren R (1978) The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 143:263-279.
- Guest S, Grabenhorst F, Essick G, Chen Y, Young M, McGlone F, de Araujo I, Rolls ET (2007) Human cortical representation of oral temperature. *Physiol Behav* 92:975-984.
- Guo SW, Reed DR (2001) The genetics of phenylthiocarbamide perception. *Ann Hum Biol* 28:111-142.
- Guth L (1957) The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat Rec* 128:715-731.
- Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (2001) Imaging neural activity with temporal and cellular resolution using FISH. *Curr Opin Neurobiol* 11:579-584.
- Hallock RM, Di Lorenzo PM (2006) Temporal coding in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1145-1160.
- Hamilton RB, Norgren R (1984) Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222:560-577.
- Harada S, Marui T, Kasahara Y (1983) Analysis of the initial taste responses from rat chorda tympani nerve. *Jpn J Oral Biol* 25:566-570.
- Hargrave PA, Hamm HE, Hofmann KP (1993) Interaction of rhodopsin with the G-protein, transducin. *Bioessays* 15:43-50.
- Harrer MI, Travers SP (1996) Topographic organization of Fos-like immunoreactivity in the rostral nucleus of the solitary tract evoked by gustatory stimulation with sucrose and quinine. *Brain Res* 711:125-137.
- Harris DR (1992) Human diet and subsistence. In: Jones, S, Martin, R, Pilbeam, D (eds) *The Cambridge Encyclopedia of human evolution* Cambridge University Press Cambridge:69-74.
- Hasty P, Bradley A (1993) Gene targeting vectors for mammalian cells. In: Joyner, A L (ed) *Gene Targeting, A Practical Approach* Oxford University Press, Oxford:1-32.
- Hasty P, Rivera-Perez J, Bradley A (1991) The length of homology required for gene targeting in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 11:5586-5591.
- Hayashi S, Tajkhorshid E, Schulten K (2003) Molecular dynamics simulation of bacteriorhodopsin's photoisomerization using ab initio forces for the excited chromophore. *Biophys J* 85:1440-1449.
- Hayashi S, Gillam IC, Delaney AD, Tener GM (1978) Acetylation of chromosome squashes of *Drosophila melanogaster* decreases the background in autoradiographs from hybridization with [¹²⁵I]-labeled RNA. *J Histochem Cytochem* 26:677-679.
- He W, Danilova V, Zou S, Hellekant G, Max M, Margolskee RF, Damak S (2002) Partial rescue of taste responses of alpha-gustducin null mice by transgenic expression of alpha-transducin. *Chem Senses* 27:719-727.
- He W, Yasumatsu K, Varadarajan V, Yamada A, Lem J, Ninomiya Y, Margolskee RF, Damak S (2004) Umami taste responses are mediated by alpha-transducin and alpha-gustducin. *J Neurosci* 24:7674-7680.
- Hedrich H, Bullock GR (2004) Hans, H; (ed) *The Laboratory Mouse (Handbook of Experimental Animals)* Elsevier Academic Press London.
- Hellekant G, Ninomiya Y, DuBois GE, Danilova V, Roberts TW (1996) Taste in chimpanzee: I. The summated response to sweeteners and the effect of gymnemic acid. *Physiol Behav* 60:469-479.
- Hentschel CC, Birnstiel ML (1981) The organization and expression of histone gene families. *Cell* 25:301-313.
- Herness MS, Gilbertson TA (1999) Cellular mechanisms of taste transduction. *Annu Rev Physiol* 61:873-900.
- Herness S, Zhao FL, Lu SG, Kaya N, Shen T (2002) Expression and physiological actions of cholecystokinin in rat taste receptor cells. *J Neurosci* 22:10018-10029.

- Herness S, Zhao FL, Kaya N, Shen T, Lu SG, Cao Y (2005) Communication routes within the taste bud by neurotransmitters and neuropeptides. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i37-38.
- Hoon MA, Northup JK, Margolskee RF, Ryba NJ (1995) Functional expression of the taste specific G-protein, alpha-gustducin. *Biochem J* 309 (Pt 2):629-636.
- Hoon MA, Adler E, Lindemeier J, Battey JF, Ryba NJ, Zuker CS (1999) Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell* 96:541-551.
- Horio N, Jyotaki M, Yoshida R, Sanematsu K, Shigemura N, Ninomiya Y (2010) New frontiers in gut nutrient sensor research: nutrient sensors in the gastrointestinal tract: modulation of sweet taste sensitivity by leptin. *J Pharmacol Sci* 112:8-12.
- Houdebine LM, Attal J (1999) Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use. *Transgenic Res* 8:157-177.
- Huang AL, Chen X, Hoon MA, Chandrashekar J, Guo W, Trankner D, Ryba NJ, Zuker CS (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442:934-938.
- Huang L, Max M, Margolskee RF, Su H, Masland RH, Euler T (2003) G protein subunit G gamma 13 is coexpressed with G alpha o, G beta 3, and G beta 4 in retinal ON bipolar cells. *J Comp Neurol* 455:1-10.
- Huang L, Shanker YG, Dubauskaite J, Zheng JZ, Yan W, Rosenzweig S, Spielman AI, Max M, Margolskee RF (1999) Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci* 2:1055-1062.
- Huang YA, Maruyama Y, Roper SD (2008a) Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci* 28:13088-13093.
- Huang YA, Dando R, Roper SD (2009) Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *J Neurosci* 29:13909-13918.
- Huang YA, Maruyama Y, Stimac R, Roper SD (2008b) Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J Physiol* 586:2903-2912.
- Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Roper SD (2005a) Mouse taste buds release serotonin in response to taste stimuli. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i39-40.
- Huang YJ, Maruyama Y, Dvoryanchikov G, Pereira E, Chaudhari N, Roper SD (2007) The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:6436-6441.
- Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, Roper SD (2005b) Using biosensors to detect the release of serotonin from taste buds during taste stimulation. *Arch Ital Biol* 143:87-96.
- Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, Roper SD (2005c) Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *J Neurosci* 25:843-847.
- Hunt C, Morimoto RI (1985) Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82:6455-6459.
- Ilegems E, Iwatsuki K, Kokrashvili Z, Benard O, Ninomiya Y, Margolskee RF (2010) REEP2 enhances sweet receptor function by recruitment to lipid rafts. *J Neurosci* 30:13774-13783.
- Imai H, Terakita A, Tachibanaki S, Imamoto Y, Yoshizawa T, Shichida Y (1997) Photochemical and biochemical properties of chicken blue-sensitive cone visual pigment. *Biochemistry* 36:12773-12779.
- Inoue M, Glendinning JI, Theodorides ML, Harkness S, Li X, Bosak N, Beauchamp GK, Bachmanov AA (2007) Allelic variation of the Tas1r3 taste receptor gene selectively affects taste responses to sweeteners: evidence from 129.B6-Tas1r3 congenic mice. *Physiol Genomics* 32:82-94.
- Intelmann D, Kummerlowe G, Haseleu G, Desmer N, Schulze K, Fröhlich R, Frank O, Luy B, Hofmann T (2009) Structures of storage-induced transformation products of the beer's bitter principles, revealed by sophisticated NMR spectroscopic and LC-MS techniques. *Chemistry* 15:13047-13058.

- Ishizuka T, Kakuda M, Araki R, Yawo H (2006) Kinetic evaluation of photosensitivity in genetically engineered neurons expressing green algae light-gated channels. *Neurosci Res* 54:85-94.
- Iwatsuki K, Nomura M, Shibata A, Ichikawa R, Enciso PL, Wang L, Takayanagi R, Torii K, Uneyama H (2010) Generation and characterization of T1R2-LacZ knock-in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 402:495-499.
- Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF, 2nd (1991) Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature* 353:655-656.
- Jacobs GH, Williams GA, Fenwick JA (2004) Influence of cone pigment coexpression on spectral sensitivity and color vision in the mouse. *Vision Res* 44:1615-1622.
- Janssen S, Laermans J, Verhulst PJ, Thijs T, Tack J, Depoortere I (2011) Bitter taste receptors and $\text{G}_{\alpha 5}$ -gustducin regulate the secretion of ghrelin with functional effects on food intake and gastric emptying. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:2094-2099.
- Jastrzebska B, Tsybovsky Y, Palczewski K (2010) Complexes between photoactivated rhodopsin and transducin: progress and questions. *Biochem J* 428:1-10.
- Jensen NH, Wilbrandt R, Bensasson RV (1989) Sensitized photoisomerization of all-trans- and 11-cis-retinal. *J Am Chem Soc* 111:7877-7888
- Jeon TI, Zhu B, Larson JL, Osborne TF (2008) SREBP-2 regulates gut peptide secretion through intestinal bitter taste receptor signaling in mice. *J Clin Invest* 118:3693-3700.
- Jiang P, Ji Q, Liu Z, Snyder LA, Benard LM, Margolskee RF, Max M (2004) The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *J Biol Chem* 279:45068-45075.
- Jung HS, Akita K, Kim JY (2004) Spacing patterns on tongue surface-gustatory papilla. *Int J Dev Biol* 48:157-161.
- Kagimoto S, Yamada Y, Kubota A, Someya Y, Ihara Y, Yasuda K, Kozasa T, Imura H, Seino S, Seino Y (1994) Human somatostatin receptor, SSTR2, is coupled to adenylyl cyclase in the presence of Gi alpha 1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* 202:1188-1195.
- Kaplick M (1953) [The occurrence, distribution and histological relations of taste buds in the roof of the mouth of several mammals, especially rodents]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 38:571-590.
- Kawamura S, Tachibanaki S (2008) Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 150:369-377.
- Kaya N, Shen T, Lu SG, Zhao FL, Herness S (2004) A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R649-658.
- Kenakin T (2002a) Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:349-379.
- Kenakin T (2002b) Recombinant roulette versus the apparent virtues of 'natural' cell receptor systems: receptor genotypes versus phenotypes. *Trends Pharmacol Sci* 23:403-404.
- Khorana HG, Knox BE, Nasi E, Swanson R, Thompson DA (1988) Expression of a bovine rhodopsin gene in *Xenopus* oocytes: demonstration of light-dependent ionic currents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:7917-7921.
- Kim MR, Kusakabe Y, Miura H, Shindo Y, Ninomiya Y, Hino A (2003a) Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochem Biophys Res Commun* 312:500-506.
- Kim U, Wooding S, Ricci D, Jorde LB, Drayna D (2005) Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci. *Hum Mutat* 26:199-204.
- Kim UK, Jorgenson E, Coon H, Leppert M, Risch N, Drayna D (2003b) Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science* 299:1221-1225.
- Kinnamon JC, Sherman TA, Roper SD (1988) Ultrastructure of mouse vallate taste buds: III. Patterns of synaptic connectivity. *J Comp Neurol* 270:1-10, 56-17.

- Kinnamon JC, Taylor BJ, Delay RJ, Roper SD (1985) Ultrastructure of mouse vallate taste buds. I. Taste cells and their associated synapses. *J Comp Neurol* 235:48-60.
- Kitagawa M, Kusakabe Y, Miura H, Ninomiya Y, Hino A (2001) Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste. *Biochem Biophys Res Commun* 283:236-242.
- Kiuchi S, Yamada T, Kiyokawa N, Saito T, Fujimoto J, Yasue H (2006) Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenet Genome Res* 115:51-61.
- Knox BE, Khorana HG, Nasi E (1993) Light-induced currents in *Xenopus* oocytes expressing bovine rhodopsin. *J Physiol* 466:157-172.
- Knox BE, Barlow RB, Thompson DA, Swanson R, Nasi E (2000) Expression of phototransduction proteins in *Xenopus* oocytes. *Methods Enzymol* 316:41-49.
- Knox BE, Salcedo E, Mathiesz K, Schaefer J, Chou WH, Chadwell LV, Smith WC, Britt SG, Barlow RB (2003) Heterologous expression of limulus rhodopsin. *J Biol Chem* 278:40493-40502.
- Korb M, Ke Y, Johnson LF (1993) Stimulation of gene expression by introns: conversion of an inhibitory intron to a stimulatory intron by alteration of the splice donor sequence. *Nucleic Acids Res* 21:5901-5908.
- Korf HW, Foster RG, Ekstrom P, Schalken JJ (1985) Opsin-like immunoreaction in the retinae and pineal organs of four mammalian species. *Cell Tissue Res* 242:645-648.
- Kos CH (2004) Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 62:243-246.
- Kostenis E, Waelbroeck M, Milligan G (2005) Techniques: promiscuous G α proteins in basic research and drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 26:595-602.
- Kramer RH, Fortin DL, Trauner D (2009) New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr Opin Neurobiol* 19:544-552.
- Krautwurst D, Yau KW, Reed RR (1998) Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* 95:917-926.
- Kretz O, Barbry P, Bock R, Lindemann B (1999) Differential expression of RNA and protein of the three pore-forming subunits of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel in taste buds of the rat. *J Histochem Cytochem* 47:51-64.
- Krimm RF, Hill DL (1998) Innervation of single fungiform taste buds during development in rat. *J Comp Neurol* 398:13-24.
- Kropf A, Hubbard R (1959) The mechanism of bleaching rhodopsin. *Ann N Y Acad Sci* 74:266-280.
- Kuhn C, Bufe B, Winnig M, Hofmann T, Frank O, Behrens M, Lewtschenko T, Slack JP, Ward CD, Meyerhof W (2004) Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci* 24:10260-10265.
- Kuhn H, Wilden U (1987) Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin. *J Recept Res* 7:283-298.
- Kusano T, Kasahara Y, Kawamura Y (1971) A study on taste effectiveness of cycloheximide as a repellent to rats. *Appl Exptl Zool* 6:40-50.
- Kuwayama S, Imai H, Hirano T, Terakita A, Shichida Y (2002) Conserved proline residue at position 189 in cone visual pigments as a determinant of molecular properties different from rhodopsins. *Biochemistry* 41:15245-15252.
- Lagerstrom MC, Schiöth HB (2008) Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7:339-357.
- Lalonde ER, Eglitis JA (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.
- Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2004) Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 23:307-380.

- Law SF, Yasuda K, Bell GI, Reisine T (1993) Gi alpha 3 and G(o) alpha selectively associate with the cloned somatostatin receptor subtype SSTR2. *J Biol Chem* 268:10721-10727.
- Lawton DM, Furness DN, Lindemann B, Hackney CM (2000) Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci* 12:3163-3171.
- Lefkowitz RJ (2004) Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci* 25:413-422.
- Lefkowitz RJ (2007) Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta Physiol (Oxf)* 190:9-19.
- Lengyel P (1982) Biochemistry of interferons and their actions. *Annu Rev Biochem* 51:251-282.
- Leonard WR (2002) Food for thought. Dietary change was a driving force in human evolution. *Sci Am* 287:106-115.
- Lester HA, Nerbonne JM (1982) Physiological and pharmacological manipulations with light flashes. *Annu Rev Biophys Bioeng* 11:151-175.
- Li X, Staszewski L, Xu H, Durick K, Zoller M, Adler E (2002) Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:4692-4696.
- Li X, Glaser D, Li W, Johnson WE, O'Brien SJ, Beauchamp GK, Brand JG (2009) Analyses of sweet receptor gene (*Tas1r2*) and preference for sweet stimuli in species of Carnivora. *J Hered* 100 Suppl 1:S90-100.
- Li X, Gutierrez DV, Hanson MG, Han J, Mark MD, Chiel H, Hegemann P, Landmesser LT, Herlitze S (2005) Fast noninvasive activation and inhibition of neural and network activity by vertebrate rhodopsin and green algae channelrhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17816-17821.
- Lichtarge O, Bourne HR, Cohen FE (1996) Evolutionarily conserved Galphabeta gamma binding surfaces support a model of the G protein-receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7507-7511.
- Liman ER, Tytgat J, Hess P (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9:861-871.
- Lin B, Koizumi A, Tanaka N, Panda S, Masland RH (2008) Restoration of visual function in retinal degeneration mice by ectopic expression of melanopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:16009-16014.
- Lindemann B (1996) Taste reception. *Physiol Rev* 76:718-766.
- Lobanova ES, Herrmann R, Finkelstein S, Reidel B, Skiba NP, Deng WT, Jo R, Weiss ER, Hauswirth WW, Arshavsky VY (2010) Mechanistic basis for the failure of cone transducin to translocate: why cones are never blinded by light. *J Neurosci* 30:6815-6824.
- Lundy RF, Jr., Contreras RJ (1997) Temperature and amiloride alter taste nerve responses to Na⁺, K⁺, and NH₄⁺ salts in rats. *Brain Res* 744:309-317.
- Lundy RF, Jr., Contreras RJ (1999) Gustatory neuron types in rat geniculate ganglion. *J Neurophysiol* 82:2970-2988.
- Luo D-G, Kefalov V, Yau K-W (2008) Phototransduction in rods and cones. In: Masland, R H, Al-bright, T (eds) *The Senses Vol 1: Vision I, I Vision Elsevier, Amsterdam*:269–301.
- Lupu-Meiri M, Shapira H, Oron Y (1990) Extracellular calcium participates in responses to acetylcholine in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 262:165-169.
- Lush IE (1984) The genetics of tasting in mice. III. Quinine. *Genet Res* 44:151-160.
- Lush IE (1986) The genetics of tasting in mice. IV. The acetates of raffinose, galactose and beta-lactose. *Genet Res* 47:117-123.
- Lush IE (1991) The genetics of bitterness, sweetness, and saltiness in strains of mice. In: Wysocki, CJ; Kare, MR (eds), *Genetics of Perception and Communication Marcel Dekker New York*:227-241.
- Lush IE, Holland G (1988) The genetics of tasting in mice. V. Glycine and cycloheximide. *Genet Res* 52:207-212.

- Lyall V, Alam RI, Phan DQ, Ereso GL, Phan TH, Malik SA, Montrose MH, Chu S, Heck GL, Feldman GM, DeSimone JA (2001) Decrease in rat taste receptor cell intracellular pH is the proximate stimulus in sour taste transduction. *Am J Physiol Cell Physiol* 281:C1005-1013.
- Maehashi K, Matano M, Wang H, Vo LA, Yamamoto Y, Huang L (2008) Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 365:851-855.
- Maga JA (1990) Compound structure versus bitter taste. In: Rousseff R L (ed) *Bitterness in foods and beverages; developments in food science 25* Elsevier Amsterdam:35-48.
- Marmor MF, Martin LJ (1978) 100 years of the visual cycle. *Surv Ophthalmol* 22:279-285.
- Martin B, Dotson CD, Shin YK, Ji S, Drucker DJ, Maudsley S, Munger SD (2009) Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling in taste buds. *Ann N Y Acad Sci* 1170:98-101.
- Mathies R, Stryer L (1976) Retinal has a highly dipolar vertically excited singlet state: implications for vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:2169-2173.
- Mathies R, Oseroff AR, Stryer L (1976) Rapid-flow resonance Raman spectroscopy of photolabile molecules: rhodopsin and isorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1-5.
- Matias I, Cristino L, Di Marzo V (2008) Endocannabinoids: some like it fat (and sweet too). *J Neuroendocrinol* 20 Suppl 1:100-109.
- Matsumoto I, Ohmoto M, Narukawa M, Yoshihara Y, Abe K (2011) Skn-1a (Pou2f3) specifies taste receptor cell lineage. *Nat Neurosci* 14:685-687.
- Matsumura S, Mizushige T, Yoneda T, Iwanaga T, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T (2007) GPR expression in the rat taste bud relating to fatty acid sensing. *Biomed Res* 28:49-55.
- Matsumura S, Eguchi A, Mizushige T, Kitabayashi N, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T (2009) Colocalization of GPR120 with phospholipase-Cbeta2 and alpha-gustducin in the taste bud cells in mice. *Neurosci Lett* 450:186-190.
- Matsunami H, Montmayeur JP, Buck LB (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404:601-604.
- Matsuo E, Mochizuki A, Nakayama K, Nakamura S, Yamamoto T, Shioda S, Sakurai T, Yanagisawa M, Shiuchi T, Minokoshi Y, Inoue T (2011) Decreased intake of sucrose solutions in orexin knockout mice. *J Mol Neurosci* 43:217-224.
- Mattes RD (2009) Is there a fatty acid taste? *Annu Rev Nutr* 29:305-327.
- Max M, Shanker YG, Huang L, Rong M, Liu Z, Campagne F, Weinstein H, Damak S, Margolskee RF (2001) Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac. *Nat Genet* 28:58-63.
- McBee JK, Palczewski K, Baehr W, Pepperberg DR (2001) Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 20:469-529.
- McIntosh RP, Catt KJ (1987) Coupling of inositol phospholipid hydrolysis to peptide hormone receptors expressed from adrenal and pituitary mRNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9045-9048.
- McLaughlin SK, McKinnon PJ, Margolskee RF (1992) Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins. *Nature* 357:563-569.
- Medler KF, Margolskee RF, Kinnamon SC (2003) Electrophysiological characterization of voltage-gated currents in defined taste cell types of mice. *J Neurosci* 23:2608-2617.
- Menon ST, Han M, Sakmar TP (2001) Rhodopsin: structural basis of molecular physiology. *Physiol Rev* 81:1659-1688.
- Meyerhof W (2005) Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 154:37-72.
- Meyerhof W, Batram C, Kuhn C, Brockhoff A, Chudoba E, Bufe B, Appendino G, Behrens M (2010) The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses* 35:157-170.
- Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR (1998) An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136-141.

- Miledi R (1982) A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 215:491-497.
- Miller IJ, Jr. (1995) Anatomy of the peripheral taste system. In: Doty, RL (ed) *Handbook of olfaction and gustation* Dekker, New York:521-547.
- Miller IJ, Jr., Smith DV (1984) Quantitative taste bud distribution in the hamster. *Physiol Behav* 32:275-285.
- Miller IJ, Jr., Whitney G (1989) Sucrose octaacetate-taster mice have more vallate taste buds than non-tasters. *Neurosci Lett* 100:271-275.
- Miller IJ, Jr., Spangler KM (1982) Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat. *Chem Senses* 7:99-108.
- Milton K (2003) The critical role played by animal source foods in human (*Homo*) evolution. *J Nutr* 133:3886S-3892S.
- Ming D, Ruiz-Avila L, Margolskee RF (1998) Characterization and solubilization of bitter-responsive receptors that couple to gustducin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8933-8938.
- Miura H, Kusakabe Y, Sugiyama C, Kawamatsu M, Ninomiya Y, Motoyama J, Hino A (2001) Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse. *Mech Dev* 106:143-145.
- Miyoshi MA, Abe K, Emori Y (2001) IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chem Senses* 26:259-265.
- Mole EJ, Schaefer J, Mathiesz K, Dionne VE, Knox BE, Barlow Jr RB (1996) Limulus Retinal mRNA Induces Light-Dependent Currents in *Xenopus* Oocytes. *The Biological Bulletin* 191:264-265.
- Mombaerts P (1999) Seven-transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors. *Science* 286:707-711.
- Montag-Sallaz M, Montag D (2003) Learning-induced arg 3.1/arc mRNA expression in the mouse brain. *Learn Mem* 10:99-107.
- Mountford PS, Smith AG (1995) Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet* 11:179-184.
- Mueller KL, Hoon MA, Erlenbach I, Chandrashekar J, Zuker CS, Ryba NJ (2005) The receptors and coding logic for bitter taste. *Nature* 434:225-229.
- Mülhardt C (2003) In: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Elsevier GmbH, München.
- Murata Y, Yasuo T, Yoshida R, Obata K, Yanagawa Y, Margolskee RF, Ninomiya Y (2010) Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol* 104:896-901.
- Murray RG (1993) Cellular relations in mouse circumvallate taste buds. *Microscopy research and technique* 26:209-224.
- Nagai T, Ueda K (1981) Stochastic properties of gustatory impulse discharges in rat chorda tympani fibers. *J Neurophysiol* 45:574-592.
- Nagel G, Brauner M, Liewald JF, Adeishvili N, Bamberg E, Gottschalk A (2005a) Light activation of channelrhodopsin-2 in excitable cells of *Caenorhabditis elegans* triggers rapid behavioral responses. *Curr Biol* 15:2279-2284.
- Nagel G, Szellas T, Kateriya S, Adeishvili N, Hegemann P, Bamberg E (2005b) Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochem Soc Trans* 33:863-866.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296:2395-2398.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13940-13945.
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109.

- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8424-8428.
- Nagy A, Moens C, Ivanyi E, Pawling J, Gertsenstein M, Hadjantonakis AK, Purity M, Rossant J (1998) Dissecting the role of N-myc in development using a single targeting vector to generate a series of alleles. *Curr Biol* 8:661-664.
- Naim M, Seifert R, Nurnberg B, Grunbaum L, Schultz G (1994) Some taste substances are direct activators of G-proteins. *Biochem J* 297 (Pt 3):451-454.
- Nakagawa Y, Nagasawa M, Yamada S, Hara A, Mogami H, Nikolaev VO, Lohse MJ, Shigemura N, Ninomiya Y, Kojima I (2009) Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One* 4:e5106.
- Nakamura E (2011) One Hundred Years since the Discovery of the "Umami" Taste from Seaweed Broth by Kikunae Ikeda, who Transcended his Time. *Chem Asian J*.
- Narukawa M, Noga C, Ueno Y, Sato T, Misaka T, Watanabe T (2011) Evaluation of the bitterness of green tea catechins by a cell-based assay with the human bitter taste receptor hTAS2R39. *Biochem Biophys Res Commun* 405:620-625.
- Nathan J, Reh R, Ankoudinova I, Ankoudinova G, Chang B, Heckenlively J, Hurley JB (2006) Scotopic and photopic visual thresholds and spatial and temporal discrimination evaluated by behavior of mice in a water maze. *Photochem Photobiol* 82:1489-1494.
- Nathans J (1999) The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24:299-312.
- Nelson G, Hoon MA, Chandrashekar J, Zhang Y, Ryba NJ, Zuker CS (2001) Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106:381-390.
- Nelson G, Chandrashekar J, Hoon MA, Feng L, Zhao G, Ryba NJ, Zuker CS (2002) An amino-acid taste receptor. *Nature* 416:199-202.
- Nelson GM, Finger TE (1993) Immunolocalization of different forms of neural cell adhesion molecule (NCAM) in rat taste buds. *J Comp Neurol* 336:507-516.
- Nelson TM, Munger SD, Boughter JD, Jr. (2003) Taste sensitivities to PROP and PTC vary independently in mice. *Chem Senses* 28:695-704.
- Nelson TM, Munger SD, Boughter JD, Jr. (2005) Haplotypes at the *Tas2r* locus on distal chromosome 6 vary with quinine taste sensitivity in inbred mice. *BMC Genet* 6:32.
- Nie Y, Vignes S, Hobbs JR, Conn GL, Munger SD (2005) Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli. *Curr Biol* 15:1948-1952.
- Niki M, Takai S, Kusuhara Y, Ninomiya Y, Yoshida R (2011) Responses to Apical and Basolateral Application of Glutamate in Mouse Fungiform Taste Cells with Action Potentials. *Cell Mol Neurobiol*.
- Nikonov SS, Kholodenko R, Lem J, Pugh EN, Jr. (2006) Physiological features of the S- and M-cone photoreceptors of wild-type mice from single-cell recordings. *J Gen Physiol* 127:359-374.
- Ninomiya Y, Shigemura N, Yasumatsu K, Ohta R, Sugimoto K, Nakashima K, Lindemann B (2002) Leptin and sweet taste. *Vitam Horm* 64:221-248.
- Nissenbaum JW, Sclafani A (1987a) Sham-feeding response of rats to Polycose and sucrose. *Neurosci Biobehav Rev* 11:215-222.
- Nissenbaum JW, Sclafani A (1987b) Qualitative differences in polysaccharide and sugar tastes in the rat: a two-carbohydrate taste model. *Neurosci Biobehav Rev* 11:187-196.
- Norgren R (1974) Gustatory afferents to ventral forebrain. *Brain Res* 81:285-295.
- Norgren R (1976) Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J Comp Neurol* 166:17-30.
- Norgren R (1978) Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 3:207-218.
- Ogawa H, Sato M, Yamashita S (1968) Multiple sensitivity of chordat typani fibres of the rat and hamster to gustatory and thermal stimuli. *J Physiol* 199:223-240.

- Ogawa H, Hayama T, Yamashita Y (1988) Thermal sensitivity of neurons in a rostral part of the rat solitary tract nucleus. *Brain Res* 454:321-331.
- Ogura T (2002) Acetylcholine increases intracellular Ca²⁺ in taste cells via activation of muscarinic receptors. *J Neurophysiol* 87:2643-2649.
- Oh SS, Hayes JM, Sims-Robinson C, Sullivan KA, Feldman EL (2010) The effects of anesthesia on measures of nerve conduction velocity in male C57Bl6/J mice. *Neurosci Lett* 483:127-131.
- Ohta-Yamakita K, Yoshioka I, Muto H, Ozeki N (1982) Distribution and development of taste buds on the incisive papillae of mice and rats. *Okajimas Folia Anat Jpn* 58:535-542.
- Ossebaard CA, Smith DV (1995) Effect of amiloride on the taste of NaCl, Na-gluconate and KCl in humans: implications for Na⁺ receptor mechanisms. *Chem Senses* 20:37-46.
- Ozeck M, Brust P, Xu H, Servant G (2004) Receptors for bitter, sweet and umami taste couple to inhibitory G protein signaling pathways. *Eur J Pharmacol* 489:139-149.
- Pappenheimer AM, Jr. (1977) Diphtheria toxin. *Annu Rev Biochem* 46:69-94.
- Parker I, Miledi R (1986) Changes in intracellular calcium and in membrane currents evoked by injection of inositol trisphosphate into *Xenopus* oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 228:307-315.
- Pease S, Williams RL (1990) Formation of germ-line chimeras from embryonic stem cells maintained with recombinant leukemia inhibitory factor. *Exp Cell Res* 190:209-211.
- Peirson SN, Halford S, Foster RG (2009) The evolution of irradiance detection: melanopsin and the non-visual opsins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2849-2865.
- Perez CA, Margolskee RF, Kinnamon SC, Ogura T (2003) Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells. *Cell Calcium* 33:541-549.
- Perez CA, Huang L, Rong M, Kozak JA, Preuss AK, Zhang H, Max M, Margolskee RF (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci* 5:1169-1176.
- Pfaffmann C (1941) Gustatory afferent impulses. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 17:243-258.
- Pfaffmann C (1974) Specificity of the sweet receptors of the squirrel monkey. *Chem Senses* 1:61-67.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.
- Pritchard T (1991) The primate gustatory system. In: Getchell, TV (ed) *Smell and taste in health and disease* Raven Press, New York:109-125.
- Pronin AN, Tang H, Connor J, Keung W (2004) Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem Senses* 29:583-593.
- Pronin AN, Xu H, Tang H, Zhang L, Li Q, Li X (2007) Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol* 17:1403-1408.
- Pugh EN, Jr., Lamb TD (1993) Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochim Biophys Acta* 1141:111-149.
- Pumplin DW, Yu C, Smith DV (1997) Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *J Comp Neurol* 378:389-410.
- Ramirez-Solis R, Zheng H, Whiting J, Krumlauf R, Bradley A (1993) Hoxb-4 (Hox-2.6) mutant mice show homeotic transformation of a cervical vertebra and defects in the closure of the sternal rudiments. *Cell* 73:279-294.
- Reed DR, Tanaka T, McDaniel AH (2006) Diverse tastes: Genetics of sweet and bitter perception. *Physiol Behav* 88:215-226.
- Rehner G, Daniel H (2002) Wahrnehmung des Geschmacks und des Geruchs der Nahrung. In: Rehner G, Daniel H (eds) *Biochemie der Ernährung*; 2 Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg:193-210.
- Ren X, Zhou L, Terwilliger R, Newton SS, de Araujo IE (2009) Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Front Integr Neurosci* 3:12.

- Rohlich P, van Veen T, Szel A (1994) Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron* 13:1159-1166.
- Rolls ET (1995) Central taste anatomy and neurophysiology. In: Doty, RL (ed) *Handbook of olfaction and gustation* Dekker, New York:549-573.
- Rolls ET (2004) The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn* 55:11-29.
- Rolls ET (2010) The affective and cognitive processing of touch, oral texture, and temperature in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 34:237-245.
- Romanov RA, Rogachevskaja OA, Bystrova MF, Jiang P, Margolskee RF, Kolesnikov SS (2007) Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *Embo J* 26:657-667.
- Romero MF, Kanai Y, Gunshin H, Hediger MA (1998) Expression cloning using *Xenopus laevis* oocytes. *Methods Enzymol* 296:17-52.
- Roper SD (1989) The cell biology of vertebrate taste receptors. *Annu Rev Neurosci* 12:329-353.
- Roper SD (2006) Cell communication in taste buds. *Cell Mol Life Sci* 63:1494-1500.
- Roper SD (2007) Signal transduction and information processing in mammalian taste buds. *Pflugers Arch* 454:759-776.
- Roper SD (2009) Parallel processing in mammalian taste buds? *Physiol Behav* 97:604-608.
- Rosen AM, Roussin AT, Di Lorenzo PM (2010) Water as an independent taste modality. *Front Neurosci* 4:175.
- Rosler P, Kroner C, Freitag J, Noe J, Breer H (1998) Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. *Eur J Cell Biol* 77:253-261.
- Rouseff RL (1990) Bitterness in food products - an overview. In: Rouseff R L (ed) *Bitterness in foods and beverages; developments in food science 25* Elsevier Amsterdam:1-14.
- Roussin AT, Victor JD, Chen JY, Di Lorenzo PM (2008) Variability in responses and temporal coding of tastants of similar quality in the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol* 99:644-655.
- Rozengurt E (2006) Taste receptors in the gastrointestinal tract. I. Bitter taste receptors and alpha-gustducin in the mammalian gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291:G171-177.
- Rozengurt E, Sternini C (2007) Taste receptor signaling in the mammalian gut. *Curr Opin Pharmacol* 7:557-562.
- Ruiz-Avila L, McLaughlin SK, Wildman D, McKinnon PJ, Robichon A, Spickofsky N, Margolskee RF (1995) Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells. *Nature* 376:80-85.
- Ruiz CJ, Wray K, Delay E, Margolskee RF, Kinnamon SC (2003) Behavioral evidence for a role of alpha-gustducin in glutamate taste. *Chem Senses* 28:573-579.
- Saari JC (2000) Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:337-348.
- Sainz E, Cavenagh MM, Gutierrez J, Battey JF, Northup JK, Sullivan SL (2007) Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochem J* 403:537-543.
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H (2004) RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 119:679-691.
- Sakmar TP (1994) G Protein-coupled receptors. In: Peroutka, S J (ed) *Handbook of Receptors and Channels: G Protein-Coupled Receptors* CRC Press, Boca Raton:257-276.
- Sako N, Shimura T, Komure M, Mochizuki R, Matsuo R, Yamamoto T (1994) Differences in taste responses to Polycose and common sugars in the rat as revealed by behavioral and electrophysiological studies. *Physiol Behav* 56:741-745.
- San Gabriel A, Uneyama H, Yoshie S, Torii K (2005) Cloning and characterization of a novel mGluR1 variant from vallate papillae that functions as a receptor for L-glutamate stimuli. *Chem Senses* 30 Suppl 1:i25-26.
- San Gabriel AM, Maekawa T, Uneyama H, Yoshie S, Torii K (2007) mGluR1 in the fundic glands of rat stomach. *FEBS Lett* 581:1119-1123.

- Sato M (1967) Gustatory response as a temperature-dependent process. *Contrib Sens Physiol* 2:223-251.
- Scacheri PC, Crabtree JS, Novotny EA, Garrett-Beal L, Chen A, Edgemon KA, Marx SJ, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS (2001) Bidirectional transcriptional activity of PGK-neomycin and unexpected embryonic lethality in heterozygote chimeric knockout mice. *Genesis* 30:259-263.
- Schiffman SS, Lockhead E, Maes FW (1983) Amiloride reduces the taste intensity of Na⁺ and Li⁺ salts and sweeteners. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:6136-6140.
- Schmid A, Dehlinger-Kremer M, Schulz I, Gogelein H (1990) Voltage-dependent InsP₃-insensitive calcium channels in membranes of pancreatic endoplasmic reticulum vesicles. *Nature* 346:374-376.
- Schoenfeld MA, Neuer G, Tempelmann C, Schussler K, Noesselt T, Hopf JM, Heinze HJ (2004) Functional magnetic resonance tomography correlates of taste perception in the human primary taste cortex. *Neuroscience* 127:347-353.
- Schubert D, Staiger JF, Cho N, Kotter R, Zilles K, Luhmann HJ (2001) Layer-specific intracolumnar and transcolumar functional connectivity of layer V pyramidal cells in rat barrel cortex. *J Neurosci* 21:3580-3592.
- Sclafani A (1987) Carbohydrate taste, appetite, and obesity: an overview. *Neurosci Biobehav Rev* 11:131-153.
- Sclafani A (2004) The sixth taste? *Appetite* 43:1-3.
- Scott TR, Giza BK (2000) Issues of gustatory neural coding: where they stand today. *Physiol Behav* 69:65-76.
- Sewards TV, Sewards MA (2001) Cortical association areas in the gustatory system. *Neurosci Biobehav Rev* 25:395-407.
- Shaaban SA, Crognale MA, Calderone JB, Huang J, Jacobs GH, Deeb SS (1998) Transgenic mice expressing a functional human photopigment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:1036-1043.
- Shapira H, Lupu-Meiri M, Gershengorn MC, Oron Y (1990) Activation of two different receptors mobilizes calcium from distinct stores in *Xenopus* oocytes. *Biophys J* 57:1281-1285.
- Sharp PA (1987) Splicing of messenger RNA precursors. *Science* 235:766-771.
- Shen T, Kaya N, Zhao FL, Lu SG, Cao Y, Herness S (2005) Co-expression patterns of the neuropeptides vasoactive intestinal peptide and cholecystokinin with the transduction molecules alpha-gustducin and T1R2 in rat taste receptor cells. *Neuroscience* 130:229-238.
- Shi P, Zhang J (2006) Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol Biol Evol* 23:292-300.
- Shi P, Zhang J, Yang H, Zhang YP (2003) Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Mol Biol Evol* 20:805-814.
- Shichi H, Somers RL (1974) Possible involvement of retinylidene phospholipid in photoisomerization of all-trans-retinal to 11-cis-retinal. *J Biol Chem* 249:6570-6577.
- Shin YJ, Park JH, Choi JS, Chun MH, Moon YW, Lee MY (2010a) Enhanced expression of the sweet taste receptors and alpha-gustducin in reactive astrocytes of the rat hippocampus following ischemic injury. *Neurochem Res* 35:1628-1634.
- Shin YK, Martin B, Golden E, Dotson CD, Maudsley S, Kim W, Jang HJ, Mattson MP, Drucker DJ, Egan JM, Munger SD (2008) Modulation of taste sensitivity by GLP-1 signaling. *J Neurochem* 106:455-463.
- Shin YK, Martin B, Kim W, White CM, Ji S, Sun Y, Smith RG, Sevigny J, Tschop MH, Maudsley S, Egan JM (2010b) Ghrelin is produced in taste cells and ghrelin receptor null mice show reduced taste responsiveness to salty (NaCl) and sour (citric acid) tastants. *PLoS One* 5:e12729.

- Shirokova E, Schmiedeberg K, Bedner P, Niessen H, Willecke K, Raguse JD, Meyerhof W, Krautwurst D (2005) Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J Biol Chem* 280:11807-11815.
- Sigel E, Minier F (2005) The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res* 49:228-234.
- Simon SA, de Araujo IE, Gutierrez R, Nicolelis MA (2006) The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci* 7:890-901.
- Sinclair MS, Perea-Martinez I, Dvoryanchikov G, Yoshida M, Nishimori K, Roper SD, Chaudhari N (2010) Oxytocin signaling in mouse taste buds. *PLoS One* 5:e11980.
- Singh N, Vrontakis M, Parkinson F, Chelikani P (2011) Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochem Biophys Res Commun* 406:146-151.
- Smith DV, Travers JB (1979) A metric for the breadth of tuning of gustatory neurons. *Chem Senses* 4:215-229.
- Smith DV, St John SJ (1999) Neural coding of gustatory information. *Curr Opin Neurobiol* 9:427-435.
- Smith DV, Scott TR (2003) Gustatory neural coding. In: Doty, RL (ed) *Handbook of olfaction and gustation* Dekker, New York:731-758.
- Smith DV, Boughter JD (2007) Neurochemistry of the gustatory system. In: Lajtha, A, Johnson, DA (ed) *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology* Springer, Berlin:109-135.
- Smith DV, Liu H, Vogt MB (1996) Responses of gustatory cells in the nucleus of the solitary tract of the hamster after NaCl or amiloride adaptation. *J Neurophysiol* 76:47-58.
- Smith DV, John SJ, Boughter JD (2000) Neuronal cell types and taste quality coding. *Physiol Behav* 69:77-85.
- Smith DV, Van Buskirk RL, Travers JB, Bieber SL (1983) Gustatory neuron types in hamster brain stem. *J Neurophysiol* 50:522-540.
- Smith PL, Smith JC, Houtp TA (2010) Interactions of temperature and taste in conditioned aversions. *Physiol Behav* 99:324-333.
- Smith TC, Levinson C (1989) Quinine inhibits multiple Na⁺ and K⁺ transport mechanisms in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim Biophys Acta* 978:169-175.
- Sokolov M, Lyubarsky AL, Strissel KJ, Savchenko AB, Govardovskii VI, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY (2002) Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron* 34:95-106.
- Son MJ, Hu YJ, Kim SA, Chun MH, Kim IB, Kim MS (2011) Expression of alpha-gustducin in mammalian retinas. *Neuroreport* 22:146-150.
- Spielman AI (1990) Interaction of saliva and taste. *J Dent Res* 69:838-843.
- Spielman AI (1998) Gustducin and its role in taste. *J Dent Res* 77:539-544.
- Spielman AI, Huque T, Whitney G, Brand JG (1992) The diversity of bitter taste signal transduction mechanisms. *Soc Gen Physiol Ser* 47:307-324.
- Staehler F, Riedel K, Demgensky S, Neumann K, Dunkel A, Täubert A, Raab B, Behrens M, Raguse JD, Hofmann T, Meyerhof W (2008) A role of the epithelial sodium channel in human salt taste transduction? *Chemical Perception* 1:78-90.
- Stapleton JR, Lavine ML, Wolpert RL, Nicolelis MA, Simon SA (2006) Rapid taste responses in the gustatory cortex during licking. *J Neurosci* 26:4126-4138.
- Starostik MR, Rebello MR, Cotter KA, Kulik A, Medler KF (2010) Expression of GABAergic receptors in mouse taste receptor cells. *PLoS One* 5:e13639.
- Stein LJ, Nagai H, Nakagawa M, Beauchamp GK (2003) Effects of repeated exposure and health-related information on hedonic evaluation and acceptance of a bitter beverage. *Appetite* 40:119-129.
- Steiner JE, Glaser D, Hawilo ME, Berridge KC (2001) Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates. *Neurosci Biobehav Rev* 25:53-74.

- Stewart JE, Feinle-Bisset C, Keast RS (2011) Fatty acid detection during food consumption and digestion: Associations with ingestive behavior and obesity. *Prog Lipid Res* 50:225-233.
- Stone LM, Barrows J, Finger TE, Kinnamon SC (2007) Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice. *Chem Senses* 32:255-262.
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA (1994) Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 63:101-132.
- Stroebele N, De Castro JM (2004) Effect of ambience on food intake and food choice. *Nutrition* 20:821-838.
- Sturz GR, Phan TH, Mummalaneni S, Ren Z, DeSimone JA, Lyall V (2011) The K⁺-H⁺ exchanger, nigericin, modulates taste cell pH and chorda tympani taste nerve responses to acidic stimuli. *Chem Senses* 36:375-388.
- Su CY, Luo DG, Terakita A, Shichida Y, Liao HW, Kazmi MA, Sakmar TP, Yau KW (2006) Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications. *Science* 311:1617-1621.
- Sun H, Macke JP, Nathans J (1997) Mechanisms of spectral tuning in the mouse green cone pigment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8860-8865.
- Suzuki T (2007) Cellular mechanisms in taste buds. *Bull Tokyo Dent Coll* 48:151-161.
- Szel A, Rohlich P, Caffè AR, Juliusson B, Aguirre G, Van Veen T (1992) Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol* 325:327-342.
- Takeda M, Suzuki Y, Obara N, Nagai Y (1992) Neural cell adhesion molecule of taste buds. *J Electron Microsc (Tokyo)* 41:375-380.
- Talavera K, Ninomiya Y, Winkel C, Voets T, Nilius B (2007) Influence of temperature on taste perception. *Cell Mol Life Sci* 64:377-381.
- Talavera K, Yasumatsu K, Voets T, Droogmans G, Shigemura N, Ninomiya Y, Margolskee RF, Nilius B (2005) Heat activation of TRPM5 underlies thermal sensitivity of sweet taste. *Nature* 438:1022-1025.
- Taniguchi K (2004) Expression of the sweet receptor protein, T1R3, in the human liver and pancreas. *J Vet Med Sci* 66:1311-1314.
- Thomas KR, Capecchi MR (1987) Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-512.
- Thomas MB, Haines SL, Akeson RA (1996) Chemoreceptors expressed in taste, olfactory and male reproductive tissues. *Gene* 178:1-5.
- Tizzano M, Cristofolletti M, Sbarbati A, Finger TE (2011) Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways. *BMC Pulm Med* 11:3.
- Todrank J, Bartoshuk LM (1991) A taste illusion: taste sensation localized by touch. *Physiol Behav* 50:1027-1031.
- Tomchik SM, Berg S, Kim JW, Chaudhari N, Roper SD (2007) Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J Neurosci* 27:10840-10848.
- Toyono T, Kataoka S, Seta Y, Shigemoto R, Toyoshima K (2007) Expression of group II metabotropic glutamate receptors in rat gustatory papillae. *Cell Tissue Res* 328:57-63.
- Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Oda M, Toyoshima K (2011) Differential expression of the glucose transporters in mouse gustatory papillae. *Cell Tissue Res*.
- Toyono T, Seta Y, Kataoka S, Kawano S, Shigemoto R, Toyoshima K (2003) Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae. *Cell Tissue Res* 313:29-35.
- Travers JB (1988) Efferent projections from the anterior nucleus of the solitary tract of the hamster. *Brain Res* 457:1-11.
- Travers JB, Smith DV (1979) Gustatory sensitivities in neurons of the hamster nucleus tractus solitarius. *Sens Processes* 3:1-26.

- Travers JB, Herman K, Yoo J, Travers SP (2007) Taste reactivity and Fos expression in GAD1-EGFP transgenic mice. *Chem Senses* 32:129-137.
- Travers SP (1993) Orosensory processing in neural systems of the nucleus of the solitary tract. In: Simon, SA, Roper, SD (ed) *Mechanisms of Taste Transduction* CRC Press, Boca Raton:339-394.
- Travers SP (2002) Quinine and citric acid elicit distinctive Fos-like immunoreactivity in the rat nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R1798-1810.
- Travers SP, Smith DV (1984) Responsiveness of neurons in the hamster parabrachial nuclei to taste mixtures. *J Gen Physiol* 84:221-250.
- Travers SP, Norgren R (1991) Coding the sweet taste in the nucleus of the solitary tract: differential roles for anterior tongue and nasoincisor duct gustatory receptors in the rat. *J Neurophysiol* 65:1372-1380.
- Travers SP, Norgren R (1995) Organization of orosensory responses in the nucleus of the solitary tract of rat. *J Neurophysiol* 73:2144-2162.
- Travers SP, Pfaffmann C, Norgren R (1986) Convergence of lingual and palatal gustatory neural activity in the nucleus of the solitary tract. *Brain Res* 365:305-320.
- Treesukosol Y, Blonde GD, Spector AC (2009) T1R2 and T1R3 subunits are individually unnecessary for normal affective licking responses to Polycose: implications for saccharide taste receptors in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R855-865.
- Treesukosol Y, Smith KR, Spector AC (2011) The functional role of the T1R family of receptors in sweet taste and feeding. *Physiol Behav.*
- Tzingounis AV, Nicoll RA (2006) Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron* 52:403-407.
- Ueda T, Ugawa S, Yamamura H, Imaizumi Y, Shimada S (2003) Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci* 23:7376-7380.
- Van Buskirk RL, Smith DV (1981) Taste sensitivity of hamster parabrachial pontine neurons. *J Neurophysiol* 45:144-171.
- van der Kooy D, Koda LY, McGinty JF, Gerfen CR, Bloom FE (1984) The organization of projections from the cortex, amygdala, and hypothalamus to the nucleus of the solitary tract in rat. *J Comp Neurol* 224:1-24.
- Vandenbeuch A, Clapp TR, Kinnamon SC (2008) Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci* 9:1.
- Vandenbeuch A, Tizzano M, Anderson CB, Stone LM, Goldberg D, Kinnamon SC (2010) Evidence for a role of glutamate as an efferent transmitter in taste buds. *BMC Neurosci* 11:77.
- Van Gelder RN (2003) Making (a) sense of non-visual ocular photoreception. *Trends Neurosci* 26:458-461.
- Venter JC et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.
- Verhagen JV, Giza BK, Scott TR (2003) Responses to taste stimulation in the ventroposteromedial nucleus of the thalamus in rats. *J Neurophysiol* 89:265-275.
- Verhagen JV, Kadohisa M, Rolls ET (2004) Primate insular/opercular taste cortex: neuronal representations of the viscosity, fat texture, grittiness, temperature, and taste of foods. *J Neurophysiol* 92:1685-1699.
- Vigh B, Manzano MJ, Zadori A, Frank CL, Lukats A, Rohlich P, Szel A, David C (2002) Nonvisual photoreceptors of the deep brain, pineal organs and retina. *Histology and histopathology* 17:555-590.
- Waddell WH, Hopkins DL (1977) Trans leads to cis photoisomerization of all-trans retinal. *J Am Chem Soc* 99:6457-6459.
- Waddell WH, Chihara K (1981) Activation barriers for the trans-cis photoisomerization of all-trans-retinal. *J Am Chem Soc* 103 7389-7390.

- Wald G, Brown PK, Hubbard R, Oroshnik W (1955) Hindered Cis Isomers of Vitamin a and Retinene: The Structure of the Neo-B Isomer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 41:438-451.
- Wang J, Cao LG, Wang YL, Pederson T (1991) Localization of pre-messenger RNA at discrete nuclear sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7391-7395.
- Wang X, Thomas SD, Zhang J (2004) Relaxation of selective constraint and loss of function in the evolution of human bitter taste receptor genes. *Hum Mol Genet* 13:2671-2678.
- Warren RP, Lewis RC (1970) Taste polymorphism in mice involving a bitter sugar derivative. *Nature* 227:77-78.
- Whiteside B (1927) Nerve Overlap in the Gustatory Apparatus of the Rat. *J Comp Neurol* 44:363-377.
- Whitney G, Harder DB (1986) Single-locus control of sucrose octaacetate tasting among mice. *Behav Genet* 16:559-574.
- Whitney G, Harder DB (1994) Genetics of bitter perception in mice. *Physiol Behav* 56:1141-1147.
- Wieboldt R, Gee KR, Niu L, Ramesh D, Carpenter BK, Hess GP (1994) Photolabile precursors of glutamate: synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8752-8756.
- Witt M, K. R, Miller Jr. I (2003) Morphology of the peripheral taste system. In: Doty RL (ed) *Handbook of olfaction and gustation* Dekker, Ney York:651-677.
- Wong GT, Gannon KS, Margolskee RF (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature* 381:796-800.
- Wu SV, Chen MC, Rozengurt E (2005) Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat. *Physiol Genomics* 22:139-149.
- Wu SV, Rozengurt N, Yang M, Young SH, Sinnott-Smith J, Rozengurt E (2002) Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2392-2397.
- Xu H, Staszewski L, Tang H, Adler E, Zoller M, Li X (2004) Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14258-14263.
- Yagi T, Ikawa Y, Yoshida K, Shigetani Y, Takeda N, Mabuchi I, Yamamoto T, Aizawa S (1990) Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9918-9922.
- Yamamoto T, Yuyama N, Kawamura Y (1981) Cortical neurons responding to tactile, thermal and taste stimulations of the rat's tongue. *Brain Res* 221:202-206.
- Yamashita S, Sato M (1965) The effects of temperature on gustatory response of rats. *J Cell Physiol* 66:1-17.
- Yan W, Sunavala G, Rosenzweig S, Dasso M, Brand JG, Spielman AI (2001) Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C742-751.
- Yang R, Crowley HH, Rock ME, Kinnamon JC (2000) Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 424:205-215.
- Yau KW (1994) Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:9-32.
- Yau KW, Hardie RC (2009) Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139:246-264.
- Yee KK, Sukumaran SK, Kotha R, Gilbertson TA, Margolskee RF (2011) Glucose transporters and ATP-gated K⁺ (KATP) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:5431-5436.
- Yokoyama S (2000) Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog Retin Eye Res* 19:385-419.
- Yokoyama S, Radlwimmer FB, Kawamura S (1998) Regeneration of ultraviolet pigments of vertebrates. *FEBS Lett* 423:155-158.

- Yoshida R, Ohkuri T, Jyotaki M, Yasuo T, Horio N, Yasumatsu K, Sanematsu K, Shigemura N, Yamamoto T, Margolskee RF, Ninomiya Y (2010) Endocannabinoids selectively enhance sweet taste. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:935-939.
- Yoshida R, Miyauchi A, Yasuo T, Jyotaki M, Murata Y, Yasumatsu K, Shigemura N, Yanagawa Y, Obata K, Ueno H, Margolskee RF, Ninomiya Y (2009) Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *J Physiol* 587:4425-4439.
- Zaidi FN, Whitehead MC (2006) Discrete innervation of murine taste buds by peripheral taste neurons. *J Neurosci* 26:8243-8253.
- Zarbin MA, Wamsley JK, Kuhar MJ (1981) Glycine receptor: light microscopic autoradiographic localization with [³H]strychnine. *J Neurosci* 1:532-547.
- Zeitlin S, Parent A, Silverstein S, Efstratiadis A (1987) Pre-mRNA splicing and the nuclear matrix. *Mol Cell Biol* 7:111-120.
- Zemelman BV, Lee GA, Ng M, Miesenbock G (2002) Selective photostimulation of genetically chARGed neurons. *Neuron* 33:15-22.
- Zhang F, Prigge M, Beyriere F, Tsunoda SP, Mattis J, Yizhar O, Hegemann P, Deisseroth K (2008a) Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*. *Nat Neurosci* 11:631-633.
- Zhang F, Wang LP, Brauner M, Liewald JF, Kay K, Watzke N, Wood PG, Bamberg E, Nagel G, Gottschalk A, Deisseroth K (2007) Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry. *Nature* 446:633-639.
- Zhang GH, Zhang HY, Deng SP, Qin YM, Wang TH (2008b) Quantitative study of taste bud distribution within the oral cavity of the postnatal mouse. *Arch Oral Biol* 53:583-589.
- Zhang H, Fan J, Li S, Karan S, Rohrer B, Palczewski K, Frederick JM, Crouch RK, Baehr W (2008c) Trafficking of membrane-associated proteins to cone photoreceptor outer segments requires the chromophore 11-cis-retinal. *J Neurosci* 28:4008-4014.
- Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Mueller KL, Cook B, Wu D, Zuker CS, Ryba NJ (2003) Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell* 112:293-301.
- Zhao FL, Shen T, Kaya N, Lu SG, Cao Y, Herness S (2005) Expression, physiological action, and coexpression patterns of neuropeptide Y in rat taste-bud cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:11100-11105.
- Zhao GQ, Zhang Y, Hoon MA, Chandrashekar J, Erlenbach I, Ryba NJ, Zuker CS (2003) The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell* 115:255-266.
- Zukerman S, Glendinning JI, Margolskee RF, Sclafani A (2009) T1R3 taste receptor is critical for sucrose but not Polycose taste. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296:R866-876.

8 Anhang

8.1 Geschmacksstoffe

Tab. 8.1. Zuordnung von Substanzklassen und LD₅₀-Werten (Chem ID plus; <http://toxnet.nlm.nih.gov>) zu den verwendeten Geschmacksstoffen. n, natürlich; s, synthetisch; *, lichtempfindlich; †, sofern nicht anders angegeben

Bitterstoffe	CAS- Nummer	n/s	Substanzklasse		Konzentration [mM] †	Lösungsbedingungen	oral LD50 [mg/kg KG Maus] †
			Klasse	Untergruppierung			
Absinthin	1362-42-1	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,10	DMSO	
Acesulfam K	55589-62-3	s	S-Verbindung	Thiazin	10,00	kalt	-
Acetylpyrazin	244-753-5	n	Azabenol	Pyrazin	1,00	kalt	
Allylisothiocyanat	57-06-7	n	S-Verbindung	Isocyanat	0,30	kochen*	308
Aloin	1415-73-2	n	Anthracen	Cascara	0,01	70°C*	200 (i.v.)
Amarogentin	21018-84-8	n	Terpenoid	Monoterpen (Iriodid)	1,00	DMSO	
D-Amygdalin	29883-15-6	n	Kohlenhydrat	Glycosid	3,00	80°C	343
Andrographolid	5508-58-7	n	Terpenoid	Diterpen	0,10	DMSO	11460 (i.p.)
Androsteron	53-41-8	n	Steroid	17-Ketosteroid	0,001	DMSO	
Arborescin	6831-14-7	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,10	DMSO	
Arbutin	497-76-7	n	Kohlenhydrat	Glycosid	30,00	kalt	
Arglabin	84692-91-1	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,10	DMSO	
Aristolochiasäure	313-67-7	n	Alkaloid	Phenanthren	0,01	kochen	55,9
Ascorbinsäure	50-81-7	n	Kohlenhydrat	Zuckersäure	1,00	kalt	3367
Atropin	51-55-8	n	Alkaloid	Tropan-Alkaloid	0,10	70°C*	75
Azathioprin	446-86-6	s	S-Verbindung	Thionucleosid	0,30	80°C	2500
Bacitracin	1405-89-6 (Zinksalz)	n	Peptid	Polypeptid	0,03	DMSO	> 3750
Berberin	633-65-8 (Chlorid)	n	Alkaloid	Chinolin-Alkaloid	0,01	80°C	> 29586 (pures Berberin: 329)
Betain	107-43-7	n/s	Ammoniak-Derivat (Amin)	Trimethylammonium-Verbindung	3,00	kalt	830 (i.v.)
Biotin	58-85-5	n	Pyrrol	Imidazol	1,00	kalt	
Brucin	414-273-38-0 (N-Oxidhydrat)	n	Alkaloid	Indol-Alkaloid	0,10	80°C	150 (pures Brucin)
Campher	76-22-2	n	Terpenoid	Monoterpen	1,00	70°C	1310
β-Carotin	7235-40-7	n	Terpenoid	Carotinoid	0,01	DMSO*	
Cascarillin	10118-56-6	n	Terpenoid	Diterpen	0,10	DMSO	
Chininsulfat	130-95-0	n	Alkaloid	Chinchona-Alkaloid	0,01	80°C	800
Chloramphenicol	56-75-7	n	Alkanol-Verbindung	Nitrobenzen	0,30	80°C	1500
Chlorhexidin	56-95-1 (Acetat)	s	Ammoniak-Derivat (Amid)	Biguanid	0,3 µM	DMSO	2515
Chlorogensäure	327-97-9	n	Phenol	Carboxylsäure	1,00	kalt	

Bitterstoffe	CAS- Nummer	n/s	Substanzklasse		Konzentration [mM] ⁺	Lösungs- beding- ungen	oral LD50 [mg/kg KG Maus] ⁺
			Klasse	Untergruppierung			
Chloroquin	50-63-5 (Diphosphat)	s	Qinolin	Aminoquinolin	1,00	kalt	350
Chlorpheniramin	113-92-8 (Chlorphenamin- Maleat)	s	Pyridin	Pheniramin	0,10	kalt	121
Cnicin	24394-09-0	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,10	DMSO	452
Cobalamin	13870-90-1	n	Pyrrol	Corrinoid	0,1 µM	DMSO	
Coffein	58-08-2	n	Alkaloid	Xanthin-Alkaloid	1,00	kalt	127
Colchicin	64-86-8	n	Alkaloid	Cholchicin-Alkaloid	3,00	kalt	5,89
Cortison	53-06-5	n	Steroid	17-Hydroxycortico- steroid	0,003	DMSO	
Costunolid	553-21-9	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,03	DMSO	
Coumarin	91-64-5	n	Pyran	Benzopyran	0,30	80°C	196
Creatinin	60-27-5	n	Pyrrol	Imidazol	3,00	kalt	
Crotalin	315-22-0	n	Alkaloid	Pyrrol-Alkaloid	0,01	70°C	
Cucurbitacin B	6199-67-3	n	Terpenoid	Triterpen	0,10	kochen	14
Cucurbitacin D	3877-86-9	n	Terpenoid	Triterpen	0,30	80°C	5
Cucurbitacin E	18444-66-1	n	Terpenoid	Triterpen	0,10	kochen	340
Cucurbitacin I	2222-07-1	n	Terpenoid	Triterpen	0,15	80°C	5
Curcumin	458-37-7	n	Alkan	Catechol	0,10	80°C	> 2000
Cycloheximid	66-81-9	n	Piperidin	Carbonsäureimid	1,00	80°C	133
Denatonium- benzoat	3734-33-6	s	Ammoniak- Derivat (Amin)	quartäre Ammoni- um-Verbindung	3,00	80°C	584 (Ratte)
Dentonium- saccharid	90823-38-4	s	Ammoniak- Derivat (Amin)	quartäre Ammoni- um-Verbindung	3,00	70°C	
Dicumarol	66-76-2	n	Pyran	Benzopyran	0,001	70°C	233
Digitonin	11024-24-1	n	Kohlenhydrat	Herzglycosid	0,001	80°C	90
Dimethylsulfon	67-71-0	n	Sulfon	Sulfoxid	10,00	kalt	5000 (Ratte)
Diphenidol	3254-89-5 (Hydrochlorid)	s	Piperidin		0,01	90°C	400
Docosahexaen- säure	6217-54-5	n	Lipid	Omega-3-Fettsäure	0,03	DMSO	keine Gefahr
Emetin	316-42-7 (Hydrochlorid)	n	Alkaloid	Isoquinolin-Alkaloid	0,03	80°C	0,015
Epicatechin	490-46-0	n	Pyran	Flavonoid	1,00	DMSO	1000 (i.p.)
Epigallocatechin- gallat	989-51-5	n	Pyran	Flavonoid	0,01	kalt*	2170
Eriodictyol	552-58-9	n	Pyran	Flavonoid	0,01	DMSO	
Erythromycin	114-07-8	n	Kohlenhydrat	Makrolid	0,30	80°C	2580
Ethylpyrazin	13925-00-3 (2-Ethylpyrazin)	n	Azabenol	Pyrazin	3,00	kalt	
Falcarindiol	55297-87-5	n	Lipid	Polyacetylen	0,03	DMSO (1 h haltbar)	
Folsäure	59-30-3	n	Pteridin	Pterin	0,30	kalt*	10000

Bitterstoffe	CAS- Nummer	n/s	Substanzklasse		Konzentration [mM] ⁺	Lösungs- beding- ungen	oral LD50 [mg/kg KG Maus] ⁺
			Klasse	Untergruppierung			
Genistein	446-72-0	n	Pyran	Isoflavonoid	0,01	DMSO	500 (i.p.)
Genistin	529-59-9	n	Pyran	Flavonoid	0,03	DMSO	2000 (i.p.)
Ginkgolid A	15291-75-5	n	Terpenoid	Diterpen	0,30	DMSO	
Helicin	618-65-5	n	Kohlenhydrat	Glycosid	10,00	kalt	
Humulon	26472-41-3	n		Cyclohexen	0,003	DMSO	
Indol-3-essigsäure	6505-45-9 (Natriumsalz)	n		Indol	1,00	kalt*	150 (i.p.)
Indol-3-carbinol	700-06-1	n		Indol	0,30	kalt*	
Lidocain	137-58-6	s	Ammoniak- Derivat (Amid)	Acetanilid	0,03	80°C	220
Limonin	1180-71-8	n	Terpenoid	Triterpen	0,30	DMSO	
Naringin	10236-47-2	n	Pyran	Flavanon	0,01	90°C	2000 (Ratte, i.p.)
Natriumbenzoat	532-32-1	s	Carboxylsäure	Benzolsäure	10,00	70°C	1600
Neohesperidin	13241-33-3	n	Pyran	Flavanon	0,10	kochen	
Nicotin	54-11-5	n	Alkaloid	Pyridin-Alkaloid	0,10	kalt*	3,34
Noscapin	912-60-7 (Hydrochlorid- hydrat)	n	Alkaloid	Isochinolin-Alkaloid	0,01	DMSO	853 (pures Noscapin)
Ouabain	11018-89-6	n	Kohlenhydrat	Herzglycosid	3,00	80°C*	
Pantothensäure	137-08-6 (D-Calciumsalz)	n	Aminosäure	Alaninderivat	1,00	kalt	10
Papaverin	61-25-6 (Hydrochlorid)	n	Alkaloid	Isoquinolin-Alkaloid	0,01	80°C*	130
Parthenolid	20554-84-1	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,10	DMSO	
Phenanthrolin	5144-89-8 (Monohydrat)	s		Phenanthren-Derivat	1,00	70°C	
Phenyl-beta-D- Glucose	1464-44-4		Kohlenhydrat	Glycosid	10,00	70°C	980 (i.p.)
Phenylethylisothio- cyanat	2257-09-2	n	S-Verbindung	Isothiocyanat	0,03	80°C	700
Phenylthiocarbamid (PTC)	103-85-5 (1-Phenyl-2- Thiourea)	s	S-Verbindung	Phenylthiourea	0,10	80°C	10
Picrotin	21416-53-5	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	1,00	70°C	135 (i.p.)
Picrotoxinin	17617-45-7	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	1,00	70°C	8,98 (i.p.)
Pilocarpin	54-71-7 (Hydrochlorid)	n	Alkaloid		1,00	kalt	200
Progesteron	57-83-0	n	Steroid	C21-Steroidhormon	0,003	DMSO	100 (i.v.)
5-Propyl-2-thio- uracil	2954-52-1	s	Pyrimidin	Thiouracil	0,10	70°C	
6-Propyl-2-thio- uracil (PROP)	51-52-5	s	Pyrimidin	Thiouracil	1,00	80°C	0,75 (Appli- kationsort unbekannt)
Pyridoxin	58-56-0 (Hydrochlorid)	n	Pyridin	Picolin	1,00	kalt	5500
Pyrocatechin	120-80-9	n	Phenol	Catechol	1,00	kalt	260

Bitterstoffe	CAS- Nummer	n/s	Substanzklasse		Konzentration [mM] ⁺	Lösungs- beding- ungen	oral LD50 [mg/kg KG Maus] ⁺
			Klasse	Untergruppierung			
Quassin	76-78-8	n	Terpenoid	Triterpenlacton	0,30	kochen	
Resveratrol	501-36-0	n	Phenol	Stilben	0,01	DMSO	
Riboflavin	83-88-5	n	Pteridin	Flavin	0,01 µM	DMSO	10000 (Ratte)
Salicin	138-52-3	n	Kohlenhydrat	Glycosid (Benzyl- alkohol)	10,00	kalt	> 500 (i.p.)
Salicylsäure	69-72-7	n	Phenol	Phenolcarbonsäure	1,00	kurz 70°C	480
Santonin	481-06-1	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,10	DMSO*	900
Sinigrin	3952-98-5	n	Kohlenhydrat	Glucosinolat/Senföl- glycosid	1,00	70°C*	
Solanidin	80-78-4	n	Steroid	Diosgenin	0,01	DMSO	
α-Solanin	20562-02-01	n	Steroid	Steroid-Alkaloid	0,001	DMSO	
Sparteïn	6160-12-9 (Sulfat)	n	Alkaloid	Quinolizin-Alkaloid	0,30	70°C	220 (pures Sparteïn)
Strychnin	66-32-0 (Nitrat)	n	Alkaloid	Indol-Alkaloid	0,03	kalt*	0,93 (pures Strychnin: 2)
Sucroseoctaacetat (SOA)	126-14-7	s	Kohlenhydrat	Glycosid	0,30	70°C	> 5000 (Ratte)
L-Sulforaphan	142825-10-3 [(R)-Sulforaphan]	n	S-Verbindung	Isothiocyanat	0,30	DMSO	
Tanninsäure	1401-55-4	n	Phenol	Gerbstoffpolymer	0,10	kalt*	2000
Tatridin A	41653-75-2	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,30	DMSO	
Tatridin B	41653-76-3	n	Terpenoid	Sesquiterpenlacton	0,30	DMSO	
Taurin (Amino- ethansulfonsäure)	107-35-7	n	S-Verbindung/ Alkan	Sulfonsäure	100,00	kalt	7000
Taurocholsäure	145-42-6 (Natriumsalz)	n	S-Verbindung/ Steroid	Sulfonsäure	0,30	kalt	110 (Ratte, i.v.)
Theobromin	83-67-0	n	Alkaloid	Xanthin-Alkaloid	1,00	50°C	837
Theophyllin	58-55-9	n	Alkaloid	Xanthin-Alkaloid	10,00	70°C	235
Thiamin	67-03-8 (Hydrochlorid)	n	S-Verbindung	Thiazol	1,00	kalt*	8224
α-Thujon	76231-76-0	n	Terpenoid	Monoterpen	0,30	70°C	500 (Ratte)
Trigonellin	6138-41-6 (Hydrochlorid)	n	Alkaloid		0,3	kalt	5000 (Ratte, pures Trigonellin)
Xanthotoxin (Methoxsalen)	298-81-7	n	Pyran	Psoralen	0,1	kochen	423
Yohimbin	65-19-0 (Hydrochlorid)	n	Alkaloid	Indol-Alkaloid	0,3	80°C	40

8.2 Oligonukleotide

Tab. 8.2. Verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Bestimmung des Ligandenspektrums muriner Bitterrezeptoren (<i>Calcium-Imaging-Experimente</i>)		
Verbindungsstück zur Generierung eines pEAK10-Leervektors for	<i>EcoRI</i> & <i>NotI</i>	AATTC TGAGT GACT GACGC
Verbindungsstück zur Generierung eines pEAK10-Leervektors rev	<i>EcoRI</i> & <i>NotI</i>	GGCCG CCGTCAGTCACTCAG
Tas2r102 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC GAATTC GCC ACC ATGAACATGGAATCTGTCC TTCACAAC TTT
Tas2r102 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCCTCATAGATTTGTTTGCAACA CAGAATACAC
Tas2r105 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i>	GGC CAATTG GAATTC ATGCTGAGTGCGGCAGAAG
Tas2r105 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCT CAATTG TCATCAGCGG CCGCCAAAGAACTT TAATCCTTG CAGTACCTTTA
Tas2r108 for	<i>EcoRI</i>	AGGG GAATTC ATGCTCTGGAACTGTATGTATTTG TGTTTGC
Tas2r108 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCCTTGTAGAAACAGAAAATCTTC TTTGCTTTAGCTTTC
Tas2r109 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC GAATTC GCC ACC ATGGAGCATCTTTTGAAGA GAACATTTGA
Tas2r109 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCCTTTCACATAATTTGGCCTGCAT TTCAG
Tas2r114 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC CAATTG GAATTC GCC ACC ATGCTGAGCACAA TGGAAGGTGTC C
Tas2r114 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCT CAATTG TCATCAGCGG CCGCCTGTGTCTCT GAGTTCTTTACCATTCTCACAGC
Tas2r115 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC GAATTC GCC ACC ATGTGTGCTGTTCTACGTA GCATACTGACA
Tas2r115 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCTGAATCCAAGGTTTTCTCACGC TTG
Tas2r118 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i>	GGC CAATTG GAATTC GCC ACC ATGGTGCCAACGC AAGTCACCATC
Tas2r118 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCT CAATTG TCATCAGCGG CCGCGGAAGGCT CTGGGCTCCAGA ACTG
Tas2r119 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC CAATTG GAATTC GCC ACC ATGGAAGGTCATA TGCTCTTCTTCTCCA
Tas2r119 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCT CAATTG TCATCAGCGG CCGCAGATGGCAT TGACAGGCTTCTGAGCA
Tas2r120 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	AGGG GAATTC GCC ACC ATGAATTTGGTAGAATGG ATTGTTACCATCATAATGA
Tas2r120 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCGCATCTCATCTGCCTCAGCAA CAACAG
Tas2r131 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC GAATTC GCC ACC ATGTATATGATACTGGTAAG AGCAGTATTTATAACTGGA
Tas2r131 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCGTAAAGACTGGAGAATCTATGA AGGGAGAGG
Tas2r136 for	<i>MfeI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC CAATTG GCC ACC ATGAAATCACAGCCAGTGA CACAACAGC
Tas2r136 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGG CCGCCAGGTTTCTTTTCTTTCAGCCAG AACCTTG

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Tas2r138 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGCCAATTGGAATTCGCCACCATGCTGAGTCTGA CTCCTGTCTTAAGTGTGTC
Tas2r138 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCCGCCGAGTGTCT GGGAGGAACCTTGTGG
Tas2r140 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak- Sequenz	GGCCAATTCGCCACCATGAATGCTACTGTGAAGT GTACATTATTAATCATCTT
Tas2r140 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGGCCGCCAGGACCTGGGAGTTCTGCAGC ATTAA
Tas2r143 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak- Sequenz	GGCCAATTCGCCACCATGCCCTCCACACCCACAT TGATC
Tas2r143 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGGCCGCCAAACCTCATCTTCAGGGCCTTT CTCAG
Tas2r144 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak- Sequenz	GGCCAATTCGCCACCATGGCAATAATTACCACAA ATTCTGACTATTTTG
Tas2r144 rev	<i>NotI</i>	TCAGCGGCCGCCCTTTTAAGGTAAAGATGAACA TGGTGCTG
Oozyten-Experimente		
Opsin hRho für pGEHME5 for	<i>BamHI</i> ; Kozak- Sequenz	GGGGGATCCGCCACCATGAATGGCACAGAAGGC CCTAAGTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGG GTG
Opsin hRho für pGEHME5 rev	<i>XbaI</i>	GGGTCTAGATTAGGCCGGGGCCACCTGGCTCGT CTCCGTCTTGGACACGGTA
mOpsin mws für pGEHME5 for	<i>EcoRI</i> ; Kozak- Sequenz	GGGGAATTCGCCACCATGTCAGGAGAGGATGAC TTTTACCTGTTTCAG
mOpsin mws für pGEHME5 rev	<i>HindIII</i>	GGGGGAAGCTTTCAGTGAGGGCCAACTTTGCTA GAAGAGA
mOpsin sws für pGEHME5 for	<i>BamHI</i> ; Kozak- Sequenz	GGGGATCCGCCACCATGGCCCAAAGGCTTACA GGTGAACA
mOpsin sws für pGEHME5 rev	<i>XbaI</i>	GGGTCTAGATTATGCAGGTGACACTGAAGAGACA GATGAGAC
Gustducin für pGEHME5 for	<i>MunI</i> & <i>KpnI</i> ; Kozak-Sequenz	CAATTGGGTACCGCCACCATGGGAAGTGAATTA GTTTCAGAGAGC
Gustducin für pGEHME5 rev	<i>MunI</i> & <i>NotI</i>	CAATTGCGGCCGCCGAGAAAATAGTTGATTAGAA AAGCCACAGTC
PLC für pGEHME5 for	<i>HindIII</i> & <i>EcoRI</i>	AAGCTTGAATTCCTCCACCATGTCTCTGCTCAACC CTGTCCT
PLC für pGEHME5 rev	<i>HindIII</i> & <i>NotI</i>	AAGCTTGCGGCCGCTCAGAGGCGGCTCTCCTG
Generierung Tas1r1-Maus		
hRho for	<i>AatII</i> ; Kozak- Sequenz	GGGACGTCGCCACCATGAATGGCACAGAAGGCC CTAAGTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGG TG
hRho rev	<i>XhoI</i>	GGCTCGAGTTAGGCCGGGGCCACCTGGCTCGTC TCCGTCTTGGACACGGTA
Linker zur Intergration von IRES-GFP-BGH in das Tas1r1-Konstrukt for	<i>XhoI</i> , <i>PacI</i> & <i>PmeI</i>	TCCGAGATGTTAATTAATAGAGTTTAAACTGCTC
Linker zur Intergration von IRES-GFP-BGH in das Tas1r1-Konstrukt rev	<i>XhoI</i> , <i>PmeI</i> & <i>PacI</i>	TCCGAGAGCAGTTTAAACTCTAATTAACATC
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 1		CTAGAGCGGACCGGTAAAA
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 2		ATAGATTATCTCCTGCTAAC

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 3		CAGCCTTGACATCGGAAGCG
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 4		AGGGCCTTAAGACTCTGGCT
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 5		AGTGCTGGGATTAAAGGTGT
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 6		CGGCAGCATCATCAACACGC
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment for 7		AGGTCCCACCCAGAGCCCTA
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 1		GATGCCACAGCCATCCCTCT
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 2		CAGACACCCTCTCTGTTGCA
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 3		ATCATAATGGAGCCCAGAGG
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 4		AGATCCCCTACTGAAAGTGAAA
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 5		TGCACACCCATATGGCGATT
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 6		TTGGCTAGTGTCTAACCTCG
Sequenzierung Tas1R1-5'- Fragment rev 7		ACCTGCTTCCAGTCCCCGCC
Sequenzierung Tas1r1-5'- Fragment/Rho for		CTTCCTGCAGATAAAACAAA
Sequenzierung hRho for		TGAAATTGCCCTGTGGTCCTT
Sequenzierung hRho rev		TAGTAGTCGATTCCACACGAGCA
Sequenzierung hRho/ACN for		AAGAACCCACTGGGTGACGATGA
Sequenzierung hRho II for		GTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAG
Sequenzierung hrGFP for		AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC
Sequenzierung hrGFP II for		CTGCAGGAGATCATGAGCTTCAAGGTGAAC
Sequenzierung hrGFP rev		ATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCCTTCACC
Sequenzierung hrGFP II rev		ATGAAGAAGTCGCTGATGTCCTCGGG
Sequenzierung IRES		CTTGTTGAATACGCTTAGGAGAGC
Sequenzierung ACN for 1		TAAAGCTCTGAGTGAGGGTGGGA
Sequenzierung ACN rev 1		ACATACCCATTTCTGCTTAGGGC
Sequenzierung ACN for 2		ATGGTGCAAGTTGAATAACCGG
Sequenzierung ACN rev 2		GTGAAACAGCATTGCTGTCACT
Sequenzierung ACN for 3		TCGAGCGATGGATTTCCGTC
Sequenzierung ACN rev 3		CTCTGACCAGAGTCATCCTAAA
Sequenzierung ACN for 4		TAATATTCAGTCGCCAGCCG
Sequenzierung ACN rev 4		GGGCCTCGTTCATGAATATT
Sequenzierung ACN for 5		CGTCAGAAAGAACACCCAAC

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Sequenzierung ACN rev 5		TTGTTCAATGGCCGATCCCA
Sequenzierung ACN for 6		CAGGATCTCCTGTCATCTCA
Sequenzierung ACN rev 6		CCATGATATTTCGGCAAGCAG
Sequenzierung ACN for 7		ATCGATCCGTCGATCGACA
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment/ACN rev		TAGGCTCCTACTCCAGCTAGTT
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment for 1		AGCAGTGAAGCCGGTGTGA
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment for 2		ACACAGCCAGAGTGGAGTCTT
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment for 3		CCTTCAGGTGGCTTTTCAC
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment rev 1		CCAGCCTTCAGTTCCAACAT
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment rev 2		TGTTCAAGGCGCACTGGA
Sequenzierung Tas1R1-3'- Fragment rev 3		ACATGGGAAGCCAGTGGTCT
Generierung Tas1r2-Maus		
Verbindungsstück für pKO- Scrambler-Vektor for	<i>HpaI</i> , <i>AatII</i> , <i>BglII</i> , <i>Ascl</i> , <i>BamHI</i> , <i>PmeI</i> , <i>SspI</i>	AACGACGTCGAGAGATCTGGGCGCGCCAGGATC CGTTTAAACAAT
Verbindungsstück für pKO- Scrambler-Vektor rev	<i>SspI</i> , <i>PmeI</i> , <i>BamHI</i> , <i>Ascl</i> , <i>BglII</i> , <i>AatII</i> , <i>HpaI</i>	ATTGTTTAAACGGATCCTGGGCGCGCCAGATCTC TCGACGTCGTT
mOpsin mws for	<i>AatII</i> ; Kozak- Sequenz	GGGACGTCGCCACCATGGCCCAAAGGCTTACAG GTGAACA
mOpsin mws rev	<i>BglII</i>	GGGAGATCTTTATGCAGGTGACACTGAAGAGACA GATGAGAC
mOpsin mws Korrektur- fragment for	<i>AatII</i> ; Kozak- Sequenz	GACGTCGCCACCATGGCCCAAAGGCTTA
mOpsin mws Korrektur- fragment rev	<i>NcoI</i>	TAAGCCTTTGGGCCATGGTGGCGACGTC
Tas1r2-5'-Fragment for	<i>HpaI</i>	GGCAGCGTTAACCAGGCTACCAGGGTAACATGA GATGACG
Tas1r2-5'-Fragment rev	<i>AatII</i>	GGGGGCACGTCGCCAGCCAAGTAACAGCCTTA GACGATG
Tas1r2-3'-Fragment for	<i>Ascl</i>	ATTAGTTGGGCGGCCACCCACCGCCTCAGCAGC AGA
Tas1r2-3'-Fragment rev	<i>BamHI</i>	GGGGGGGATCCCTTTGAACTTGGATGTGGACC CTCACTCAC
Sequenzierung Verbindungs- stück for		CACTGCATTCTAGTTGTG
Sequenzierung Verbindungs- stück rev		CAGTTCGATGTAACCCACTC
Sequenzierung Tas1R2-5'- Fragment for 1		CTCAGCTTCCTTTTGGTTG
Sequenzierung Tas1R2-5'- Fragment for 2		GGCTGCATACCAGGTGTATG

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Sequenzierung Tas1R2-5'-Fragment rev 1		CTCAGATGTGGAATTGCCTC
Sequenzierung Tas1R2-5'-Fragment rev 2		GAAGTGAATCGTACTGTGGCTG
Sequenzierung Tas1R2-3'-Fragment for 1		CACCATAGATAGCAATGACAG
Sequenzierung Tas1R2-3'-Fragment for 2		CTTTGAGGTTTCAGAAGCCCAG
Sequenzierung Tas1R2-3'-Fragment rev 1		GACTGGCATTATTGCGTACC
Sequenzierung Tas1R2-3'-Fragment rev 2		GACCCATGATGCTCATCTGAC
Sequenzierung ACN		siehe Tas1r1-Konstrukt
Generierung Tas2r114-Maus		
Verbindungsstück für pKO-Scrambler-Vektor for	<i>XbaI</i> , <i>Acc651</i> , <i>AgeI</i> ; <i>SacI</i> , <i>BglII</i> , <i>SalI</i> , <i>NotI</i> , <i>AatII</i>	CTAGAATGGTACCTTACCGGTTAAATCCCGCGGA ACTTGAGATCTATAGTCGACGATAATCGCGGCCG CACGTTAAGACGT
Verbindungsstück für pKO-Scrambler-Vektor rev	<i>AatII</i> , <i>NotI</i> , <i>SalI</i> , <i>BglII</i> , <i>SacI</i> , <i>AgeI</i> , <i>Acc651</i> , <i>XbaI</i>	CTTAACGTGCGGCCGCGATTATCGTCGACTATAG ATCTCAAGTTCGCGGGATTAAACCGGTAAGGTA CCATT
mOpsin sws for	<i>SacI</i> ; Kozak-Sequenz	GGGGGGCCGCGGGCCACCATGTCAGGAGAGGA TGACTTTTACCTGTTTCAG
mOpsin sws rev	<i>BglII</i>	GGGAGATCTTCAGTGAGGGCCAACCTTTGCTAGAA GAGA
Tas2r114-5'-Fragment for	<i>Acc651</i>	GGGGTACCCTCTAGATTTAATTTTTCTTCCGGT
Tas2r114-5'-Fragment rev	<i>AgeI</i>	GACCGGTCTTTGTTGATCTTTAAAATGGCTT
Tas2r114-5'-Fragment (Punktmutations-PCR) for		CTCACCTATGTGTGGTCCTTGAATACCAGAACATG
Tas2r114-5'-Fragment (Punktmutations-PCR) rev		CATGTTCTGGTATTCAAGGACCACACATAGGTGA G
Tas2r114-3'-Fragment for	<i>SalI</i>	GGGTCGACAGTCTGGAACACATGCAATCTGGA ATT
Tas2r114-3'-Fragment rev	<i>NotI</i>	GCGGCCGGCGGCCGAGTCGGAAAAATTGGCTA TCTTCAGGAAATA
Sequenzierung Tas2R114-5'-Fragment for 1		AAAGTTTCCAACCATGCCTCAGGGGTACATGTTC CACTATGTT
Sequenzierung Tas2R114-5'-Fragment for 2		TGTAGAGCCTACCTCTAGCAGAAAGACAGGGCA TCAAGTGCG
Sequenzierung Tas2R114-5'-Fragment for 3		ACTCATCTTTGCCTCCCTCTTGCCCTGTTGGCTG TAAGTA
Sequenzierung Tas2R114-5'-Fragment rev 1		TTCTCTGGCATCATAGCACTATTAACCTCAGAATCA TACAA
Sequenzierung Tas2R114-5'-Fragment rev 2		AGTTCCTCTCCACACTGTAGGGCATTTCATCTTA GGTCC
Sequenzierung Tas2R114-5'-Fragment rev 3		TGGAACTTTTTGGGTGTATTCTAAGAGTGGTAT TGCTG
Sequenzierung Tas2R114-3'-Fragment for 1		AATCAGACAGAGAGGAGTTCCCTCAAATAAACA GCTGGT
Sequenzierung Tas2R114-3'-Fragment for 2		AATTTCTTCTGTTTATATCTGTCACTCCTACTCAA CTAC

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Sequenzierung Tas2R114-3'- Fragment rev 1		TAATTTCCCCTCTGATACTATTTTGCATGTAATAAG TCTA
Sequenzierung Tas2R114-3'- Fragment rev 2		GGTCTTATAAAATTCTAGTGAGTAAGCAAGAATAA TGGTG
Sequenzierung ACN		siehe Tas1r1-Konstrukt
Genotypisierung		
Tas1r1-Wildtyp-PCR for		GAATCCACCTGGTTTCCATCCACGTC
Tas1r1-Wildtyp-PCR rev		CTCTCAGGGTGACTTCAGTCTTTAGAGATGG
Tas1r1-Knockin-PCR for		AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC
Tas1r1-Knockin-PCR rev		ATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCCTTCACC
Tas1r2-Wildtyp-PCR for		GACACCAAATGAATGGATGAGGCTG
Tas1r2-Wildtyp-PCR rev		TGAGGTGAGAGACGCTCTTCACGTT
Tas1r2-Knockin-PCR for		GACACCAAATGAATGGATGAGGCTG
Tas1r2-Knockin-PCR rev		CCCAGAACGAAGTAGCCATAGATTTGG
Tas2r114-Wildtyp-PCR for		CCTCTTGCCCTGTTGGCTGTAAGTATGTC
Tas2r114-Wildtyp-PCR rev	<i>NotI</i>	GGCGCCGCGGCGCTCCAAAGTGAAATGATTA ACAGGAAACATACA
Tas2r114-Knockin-PCR for		CCTCTTGCCCTGTTGGCTGTAAGTATGTC
Tas2r114-Knockin-PCR rev		TGACAACGTAGCGTTCAAAGCCAGG
Southern-Blot-Sonden		
Tas1r1-Southern Blot-Sonde I for		GCATTGTGGTCTAAGGTGG
Tas1r1-Southern Blot-Sonde I rev		AATCAAACGCCTGGTAACC
Tas1r1-Southern Blot-Sonde II for	<i>AatII</i> ; <i>Kozak- Sequenz</i>	GGGACGTCGCCACCATGAATGGCACAGAAGGCC CTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGG TG
Tas1r1-Southern Blot-Sonde II rev	<i>XhoI</i>	GGCTCGAGTTAGGCCGGGGCCACCTGGCTCGTC TCCGTCTTGGACACGGTA
Tas1r2-Southern Blot-Sonde I for		TTCCCCGCCTGTCTGCTTTTCT
Tas1r2-Southern Blot-Sonde I rev		TCCATGTGGACCCCAGGCAAAT
Tas1r2-Southern Blot-Sonde II for	<i>AatII</i> ; <i>Kozak- Sequenz</i>	GGGACGTCGCCACCATGGCCCAAAGGCTTACAG GTGAACA
Tas1r2-Southern Blot-Sonde II rev	<i>BglII</i>	GGGAGATCTTATGCAGGTGACACTGAAGAGACA GATGAGAC
Tas2r114-Southern Blot- Sonde I for		GGATCAGCCAGGATGTGTTGCTCTGA
Tas2r114-Southern Blot- Sonde I rev		CCCTTCTCATGGTAGCAGCGTTAGGATTA
Tas2r114-Southern Blot- Sonde II for	<i>SacII</i> ; <i>Kozak- Sequenz</i>	GGGGGGCCGCGGGCCACCATGTCAGGAGAGGA TGACTTTTACCTGTTTCAG
Tas2r114-Southern Blot- Sonde II rev	<i>BglII</i>	GGGAGATCTTCAAGTGGAGGCAACTTTGCTAGAA GAGA

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
<i>In-situ</i>-Sonden		
Gustducin for		GTTTGAGCAAATCAACTGCC
Gustducin rev		TCATGCATTCTGTTACCTCC
Tas1r1 for		GGTCCATTTGTTCTCTGTCTC
Tas1r1 rev		TATTGCACTGGATCCTTCTGTG
Tas1r2 for	<i>SalI</i>	CCC GTCTGAC ATATAGCGCCATCACCGACAAGCTG
Tas1r2 rev	<i>NotI</i>	GGCGCCGG GCGGCCG CAGGCTGGTCTCGTTAG GCATGGG
Tas2r105 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGC CAATTGGAATTCGCCACC ATGCTGAGTGCG GCAGAAGGC
Tas2r105 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCT CAATTG TCATCAG GCGGCCG CAAAGAACTT TAATCCTTGCAGTACCTTTACAAAG
Tas2r114 for		TGTGTTCCCTAAAACCTCCAGCATGG
Tas2r114 rev		AAAAGCTCTCAGGGTCACATGCGTCT
Tas2r114 II for		AAGTTTGCTAGACCAAGGGGCTCTCTT
Tas2r114 II rev		GGCGGTTCCCTCAGAAAAGTGGACATACTAC
Rho I for		CCTAACTTCTACGTGCCCTTCTCCAAT
Rho I rev		AGTTGCTCATGGGCTTACACACCAC
Rho II for		GTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAG
Rho II rev		CCTCATCGTCACCCAGTGGGTTCTT
Opsin mws I for	<i>AatII</i> ; Kozak- Sequenz	GG GACGTCGCCACC ATGGCCCAAAGGCTTACAG GTGAACA
Opsin mws I rev		TAAGGCCAGTACCTGCTCCAACCAAAGAT
Opsin mws II for		AGACATCCTGTGGCCAGACGTGTT
Opsin mws II rev	<i>BglII</i>	GGG AGATCT TTATGCAGGTGACACTGAAGAGACA GATGAGAC
Opsin sws I for	<i>SacII</i> ; Kozak- Sequenz	GGGGGG CCGCGGGGCCACC ATGTCAGGAGAGGA TGACTTTTACCTGTTTCAG
Opsin sws I rev		TGACAACGTAGCGTTCAAAGCCAGG
Opsin sws II for		TAAACCCTTCGGCAGCATCCGCT
Opsin sws II rev	<i>BglII</i>	GGG AGATCT TCAGTGAGGGCCAACCTTTGCTAGAA GAGA
hrGFP for	<i>SalI</i>	GGGGGG GTCTGAC GTGAGCAAGCAGATCCTGAA GAACACC
hrGFP rev	<i>NotI</i>	GGGGGG GCGGCCG CTTGCTCTTCATCAGGGTG CGCAT
PCR-Analysen auf genomischer DNA und cDNA		
β-actin for		TGGGAATGGGTCAGAAGGACTCCTATG
β-actin rev		TCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGGTCCCG
Tas1r1 for		TCGCCTAGTAACGCCAAGCTGG
Tas1r1 rev		GGTGCCACTCTCACTGTCCTTTTCTAAT
Tas1r2 for		AGAGTTGCCAGCCTGGGCAAAT
Tas1r2 rev		GAAAGTTGAGCACAGTGACCAG

Oligonukleotid	Schnittstellen & Anmerkungen	Primersequenz (5' → 3')
Tas2r105 for	<i>MfeI</i> & <i>EcoRI</i> ; Kozak-Sequenz	GGCCAATTGGAATTCGCCACCATGCTGAGTGCG GCAGAAGGC
Tas2r105 rev	<i>MfeI</i> & <i>NotI</i>	TCCTCAATTGTCATCAGCGGCGCCAAAGAACTT TAATCCTTGCAGTACCTTTACAAAG
Tas2r114 for	<i>SalI</i>	CCCCTCGACTATAACAGGAACAAGAAGCTCTC TAATATTGGC
Tas2r114 rev	<i>NotI</i>	GGCGCCGGCGGCGCTCCAAAGTGAAATGATTA ACAGGAAACATACA
mRho for [Poly(A)-RNA]		GGCCCAATTTTTATGTGCCCTTC
mRho rev [Poly(A)-RNA]		GGTGAATCCTCCGAAGACCATGAAGA
hRho for		AAGGCCCTAACTTCTACGTGCCCTT
hRho rev		CAAAAGACTCGTTGTTGACCTCCGG
mOpsin mws for		CCGGTTCATAAAGACATAGATAATGGGGT
mOpsin mws rev		AGACATCCTGTGGCCAGACGTGTT
mOpsin mws for [Poly(A)-RNA]		CATCATTTCTGGGAGAGATGGCTG
mOpsin mws rev [Poly(A)-RNA]		TTGGAGGTAGCAGAGCACGATGATG
mOpsin sws for	<i>SacII</i> ; Kozak- Sequenz	GGGGGGCCGCGGGCCACCATGTCAGGAGAGGA TGACTTTTACCTGTTTCAG
mOpsin sws rev		TGACAACGTAGCGTTCAAAGCCAGG
mGustducin alpha for [Poly(A)-RNA]		GTTTGAGCAAATCAACTGCC
mGustducin alpha rev [Poly(A)-RNA]		TCATGCATTCTGTTACCTCC
mTransducin alpha for [Poly(A)-RNA]		GTACCTGAATTCAGGTGTGTCTCTTGCC
mTransducin alpha rev [Poly(A)-RNA]		TGTCATATGCAGGTAGCAGGCTGGA
PLCb2 for [Poly(A)-RNA]		TCCTCGAAGCACATTCCTGGACAA
PLCb2 rev [Poly(A)-RNA]		AGGGTCTCGCTGCTTCTGATTGAT
hrGFP for		AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC
hrGFP rev		ATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCCTTCACC
Sequenzierungsprimer für Standardvektoren		
M13 for		TGTA AACGACGGCCAGT
M13 rev		CAGGAAACAGCTATGACC
T3		AATTAACCCTCACTAAAGGG
T7		TAATACGACTCACTATAGGG
pcDNA5/FRT for		CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
pcDNA5/FRT rev (BGH)		TAGAAGGCACAGTCGAGG
pcDNA5/FRT rev II		GGAAAGGACAGTGGGAGTGCC
pEAK10 for		AGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCC
pEAK10 rev		ACCTGTCCCGCCTTGAG

8.3 *In-situ*-Sonden

Tab. 8.3. Verwendete *In-situ*-Sonden und ihre Hybridisierungs- und Waschkonditionen.

Sonden	Sondenkonzentration [ng/ml]	RNAse-Konzentration [µg/ml]	Waschkonditionen
Gustducin	600	2	50°C; 0,4x SSC
Tas1r1	800	2	50°C; 0,4x SSC
Tas1r2	800	2	50°C; 0,4x SSC
Tas2r105	800	2	50°C; 0,4x SSC
Tas2r114	200	1	60°C; 0,4x SSC
Rho	800	1	50°C; 1x SSC
Opsin mws	800	1	50°C; 1x SSC
Opsin sws	800	1	50°C; 1x SSC
hrGFP	800	1	50°C; 1x SSC

8.4 Vektorkonstrukte

8.4.1 Bitterrezeptorplasmide

Tab. 8.4. Zugrundeliegende Bitterrezeptorsequenzen der Maus in Calcium-Imaging-Experimenten.

muriner Bitterrezeptor	Rezeptor	Accession number
1	Tas2r102	DBA*
2	Tas2r103	SWR**
3	Tas2r105	NM_020501.1
4	Tas2r108	NM_020502.1
5	Tas2r109	NM_207017.1
6	Tas2r114	NM_207019.1
7	Tas2r115	DBA*
8	Tas2r118	NM_207022.1
9	Tas2r119	MGI:2681253*/***
10	Tas2r120	NM_207023.1
11	Tas2r131	NM_207030.1
12	Tas2r136	NM_181276.1
13	Tas2r138	NM_001001451.1
14	Tas2r140	NM_021562.1
15	Tas2r143	NM_001001452.1
16	Tas2r144	NM_001001453.1

* basierend auf Sequenzanalysen von Dr. Peng Shi

** basierend auf Sequenzangaben von Jean-Pierre Montmayeur, Dijon, F

*** Sequenz basierend auf www.ensembl.org; mit einem *non-synomynos* SNP C/T im Vergleich zur in der NCBI-Datenbank hinterlegten Rezeptorsequenz.

Tas2r102 (DBA)

ATGAACATGGAATCTGTCCTTCACAACCTTTGCCACTGTAATAATATGTGGAGTTTATTTTTGGGAATC
TGAGCAATGGATTCATAGTGTGTCAAACCTTCTGGACTGGGTCATTAACAAAAGCTTTCCTTAATAG
ATAAAATCTTCTTACATTGGCAATTTCAAGAATCACTCTCATCTGGGAAATATATGCTTGGTTTAAAGT
TTATATGATCCATCTTCTTTTTAATTGGAATAGAATTTCAAATTATTTATTTAGCTGGGTCCTTCTAGT
CACTTCAGCCTCTGGCTTGGCACAACCTCTCAGCATCTTTTATTTACTCAGAATAGCTAACTGCTCCTGG
CAGATCTTTCTCTATTTGAAATGGAGACTTAAACAACCTGATTGTGGGGATGTTGCTGGGAAGCTTGGT
GTTCTTGCTTGGAAATCTGATGCAAAGCATGCTTGAAGAGAGGTTCTATCAATATGGAAGGAACACAA
GTGTGAATACCATGAGCAATGACCTTGAATGTGGACCGAGCTGATCTTTTTCAACATGGCTATGTTCT
CTGTAATACCATTTACATTGGCCTTGATTTCTTTTCTCCTGCTAATCTTCTCTTTGTGGAACATCTCCA
GAAGATGCAGCTCATTTCCAGAAGACACAGAGACCCTAGCACCAAGGCCACAGGAATGCCTTGAGA
ATTATGGTCTCCTTCTTGTCTATACCATGCATTTCTGTCTCTTCTTATATCATGGATTGCTCAAAA
GCATCAGAGTGAACGGCTGATATTATTGGTATGATAACTGAACTCTTGATCCTTCAGCCCACTCATT
CATCCTGATTCTAGGAAATTCTAAATTAAGCAGGCTTCTCTTTGTATGCTGAGGCATTTGAGACGTAG
GCTGAAAGGAGAGAATATCACAAACAGCATATAGCAACCAATAACTAGCTTTTGTGTATTCTGTGTTGC
AAACAAATCTATGAGG

Tas2r103 (SWR)

ACGCGTAATGGTGTTGACAATAAGGGCTATTTTATGGGTAACATTGATAACTATTATAAGTCTGGAGTTT
ATCATAGGAATTTTAGGAAATGTATTCATAGCTCTCGTGAACATCATAGACTGGGTTAAAAGAGGAAAG
ATCTCTGCAGTGGATAAGACCTATATGGCCCTGGCCATCTCCAGGACTGGTTTTTATTGTCACTAATC
ACAGGGTTCTTGGTATCATTATTGGACCCAGCTTTATTGGGAATGAGAACGATGGTAAGGCTCCTTACT
ATTTCTGGATGGTGACCAATCATTTCAAGTGTCTGGTTTTGCAACATGCCTCAGTATCTTTATTTTCTCA
AGATAGCTAATTTCTCAAATTCTATTTTCTTGTCTCAAATGGGAAGCTAAAAAGTGGTATCAGTGAC
ATTGGTGGTATCTGTGATAATCTTGTTCATAAACATTATAGTCATAAACAAATTCCTGACAGACTTCAAG
TAAACACACTCCAGAACTGTAGTACAAGTAACACTTTAAAAGATTATGGGCTCTTTTTATTTCATTAGCAC
TGGGTTTACACTCACCCCATTCGCTGTGTCTTTGACAATGTTTCTTCTGCTCATCTTCTCCCTGTGGA
GACATCTGAAGAATATGCGTCACAGTGCCACAGGCTCCAGAGATGTCAGCACAGTGGCCACATAAAA
AGGCTTGCAAACCTGTGGTAACCTTCTGTTACTATATACTGCTTTTGTATGTCACCTTCTTTCAGAGTCT
TTGAATATTAACATTCAACATACAAATCTTCTTTCTCATTTTTTACGGAGTATAGGAGTAGCTTTTCCCA
CAGGCCACTCCTGTGTACTGATTCTTGGAAACAGTAAGCGGCCGC

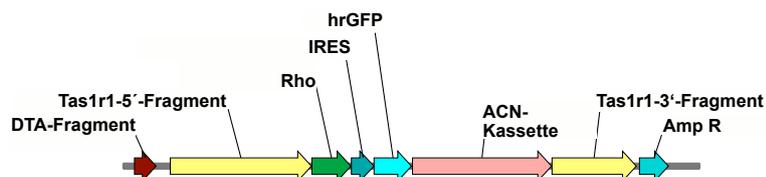
Tas2r115 (DBA)

ATGTGTGCTGTTCTACGTAGCATACTGACAATCATTTTCATTTTGGAGTTCTTCATTGGAAATCTGGGG
AATGGATTCATAGCTCTGGTACAATGCATGGACTTACAAAAGAGAAGAACGTTCCCTTCAGCAGATCAT
TTCTCACTGCTCTGGCCATCTCCAGGCTTGTCTCTGATATGGGTTTTATTTCTAGATTCATTTCTGTTA
TACAATCCCCATTACTGATGACTAGAAATACATTAAGACTGATTCAGACTGCCTGGAATATAAGCAATCA
TTTCCGTATATGGTTTGCTACCAGCCTCAGCATCTTTTATCTCTTCAAGATAGCCATTTTTTCTAACTATC
TTTTCTTCTACCTGAAGCGGAGAGTTAAAAGGGTGGTTTTGGTGACACTGCTGCTATCCATGATCCTT
TTGTTTTTTAATATATTTTTAGAAATCAAACATATTGATGTCTGGATCTATGGAACCAAAGAAACATAACT
AATGGTTTGAAGTTTGAACAATTTTTCCAGGCTTATTTTAATTCCAAGTTAATGTTACATT
AGTACCCTTTGGTGTATCCTTGATAGCTTTCCTCCTCCTAATCTTTTCCCTTATGAAACATGTAAGGAAG
ATGCAGTACTACACCAAAGGATGCAAAGATGTCAGAACCATGGCCACACCACAGCCCTGCAGACTG
TGGTTGCCTTCTCCTATTATATACTACTTTCTTTCTGTCTCTAGTTGTGGAAGTTTCAACACTTGAAT
GGATGAAAGTCTGATGCTTCTGTTTGAAGGTTACTATAATGATTTTTCTTCCATCCACTCCTGTATT
TTCATTTTGAACATAATAAGTTGAGACAGGACTTGCTTTCAGTACTGAAGTGGCTAAAGTATTGGTGC
AAGCGTGAGAAAACCTTGGATTCA

Tas2r119 (C57BL/6)

ATGGAAGGTCATATGCTCTTCTTCCTCCTGGTTGTGGTAGTGCAGTTTTTAACTGGGGTCTTGGCAAA
TGGCCTCATTGTGGTTGTCAATGCCATCGACTTGATCATGTGGAAGAAAATGGCCCCACTGGATCTGC
TTCTTTTTTGCCTGGCAACTTCTCGAATCATTCTTCAATTGTGTATATTGTTGCACAGCTGGGTCTATC
CTGTTTGGTGAGACACACGTTATTTGCTGACAATGTTACCTTTGTCTACATTATAAATGAACTGAGTCTC
TGGTTTGCCACATGGCTTGGTGTCTTCTACTGTGCCAAGATTGCTACCATCCCTCACCCACTCTTTCT
GTGGCTGAAGATGAGGATATCCAGGTTGGTGCCATGGCTGATCCTGGCATCTGTGGTCTATGTAAGT
TTACTACTTTCATCCATAGCAGAGAGACTTCAGAATTTCCTAAGCAAATCTTTATAAGCTTTTCTTCTAA
AAATACAACCTCGGGTCAGACCAGCGCATGCCACACTACTCTCAGTCTTTGTCTTTGGTCTCACACTAC
CATTCTCATCTTCACTGTTGCTGTTCTGCTCTTGTGTCCTCCCTGTGGAACACAGCCGGCAGATG
AGGACTATGGTGGGAACTAGGGAACCTAGCAGACATGCCCTCGTCAGTGCGATGCTCTCCATTCTGT
CATTCTCATCCTCTATCTCTCCATGACATGGTAGCTGTTCTGATCTGTACCCAAGGCCTCCACTTTG
GAAGCAGAACCTTTGCATTCTGCTTATTGGTTATTGGTATGTACCCCTCCTTACACTCGATTGTCTTAAT
TTAGGAAACCCTAAGCTGAAACGAAATGCAAAAATGTTCAATTGTCCATTGTAAGTGTGTCATTGTGC
AAGAGCTTGGGTCACCTCAAGGAACCCAAGACTCAGTGACTTGCCAGTGCCTGCTACTCATCACTCA
GCCAACAAGACATCCTGCTCAGAAGCCTGTACAATGCCATCT

8.4.2 Targeting-Konstrukte

Targeting-Vektor Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}

DTA-Fragment	261-837 bp
Tas1r1-5'-Fragment	1212-5015 bp
Rho	5028-6074 bp
IRES	6093-6690 bp
hrGFP	6702-7702 bp
ACN-Kassette	7732-11469 bp
Tas1r1-3'-Fragment	11473-13741 bp
Amp R	13825-14612 bp

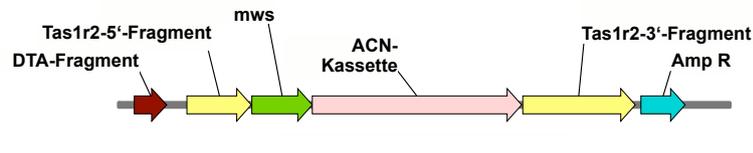
1	ACGGACCGAA	CAACTCCGCC	GCGCGCGCTC	CGTGTAGGCC	GGTGCGGGGC	GCCCCGTAGC	GCAAAGGGAGG	GCGGGAAAAG	AAGGGGCGGG	ACACAAGGGC
101	GAATCTATAA	AGGGCGTCAC	TCAGCCAGTT	CTCTCCTCAG	AAGCGCCGAG	AGCGCGACCC	GGACGGTTGG	AGAAGAAGGT	GGCTCCCGGA	AGGGGGAGAG
201	ACAAACTGCC	GTAACCTCTG	CCGTTCAAGG	TCTGCGACCT	GCAGGTCTCC	GCCATGGACC	CTGATGATGT	TGTTGATTCT	TCTAAATCTT	TTGTGATGGA
301	AAACTTTTCT	TGTTACCACG	GGACTAAACC	TGGTTATGTA	GATTCACATC	AAAAAGGTAT	ACAAAAGCCA	AAATCTGGTA	CACAAGGAAA	TTATGACGAT
401	GATTGGAAAG	GTTTTTATAG	TACCGACAAT	AAATACGACG	CTGCGGGATA	CTCTGTAGAT	AATGAAAACC	CGCTCTCTGG	AAAAGCTGGA	GGCGTGGTCA
501	AAGTGACGTA	TCCAGGACTG	ACGAAGGTTT	TCCGACTAAA	AGTGATAAAT	GCCGAAACTA	TTAAGAAAGA	GTTAGTTTTA	AGTCTCACTG	AACCGTTGAT
601	GGAGCAAGTC	GGAAACGGAAG	AGTTTATCAA	AAGGTTCCGT	GATGGTGCTT	CGCGTGTAGT	GCTCAGCCTT	CCCTTCGCTG	AGGGGACTTC	TAGCCTGTAA
701	TATATTAATA	ACTGGGAACA	GCGGAAAAGC	TAAAGCGTAG	AACCTTGAGAT	TAATTTTGA	ACCCGTGGAA	AACGTGGCCA	AGATGCGATG	TATGAGTATA
801	TGGCTCAAGC	CTGTGCAGGA	AATCGTGTCA	GCGCATCTCT	TTGTGAAGGA	ACCTTACTTC	TGTGTGTGTA	CATAATTGGA	CAAACACTCT	ACAGAGATTT
901	AAAGCTCTAA	GTAATAATATA	AAATTTTAAA	GTGTATAATG	TGTTAAACTA	CTGATTCTAA	TTGTTTGTGT	ATTTTAGATT	CCAACCTATG	GAACCTGATG
1001	ATGGGAGCAG	TGGTGGAAATG	CAGATCCACT	AGGATCTAAC	TTGTTTATTG	CAGCTTATAA	TGGTTACAAA	TAAAGCAATA	GCATCACAAA	TTTCACAAAT
1101	AAAGCATTTT	TTTCACTGCA	TTCTAGTTGT	GGTTTGTCCA	AACTCATCAA	TGATATCTAT	CATGTCTGGA	TCGTAGTTCT	AGAGCGGACC	GGTAAAACGA
1201	CGGCCAGTGT	TCCATTCTCT	AGGTTCTTAT	GTGCTTCTG	TACCTTAACT	TCCTCTGAAG	TGACACTGCC	CAGACCTCAC	ATCCTCTCCT	CTCAAAGTTAC
1301	ACCAGCGTGC	TTATGCGGCG	GTGCTCTCTC	TCTGCTCATT	TGTGTTCTCA	GACACCCCTC	CTGTTGCAGC	TCCCAAATGC	ACAGTCTCTAC	CCTTCTAACC
1401	GCACCTCCAC	GATGGCTATC	GACCCGTGAG	ACCGGATGTC	TCTTATTCTT	CACGGAAAGAT	TTGAGTTCTA	CTGGCAATG	AAACCAAGCA	AGCAGAGGGA
1501	ACAGGGATCA	CCGTTGTGTA	AGCCTCTATG	CCAGTGTGTC	CCTCGCCTCA	CAAGTGAGGA	TGGCACCCAC	ATCAGTCAGG	CTGTTCAAGCA	AGTGCCCTTTA
1601	CCCATACTAC	ATCTCTCTAT	AGATTATCTC	CTGCTAACAC	ATGGGATTTT	CTGAACACAC	ACCTCACTCA	CACGACAGAG	GGGATGATCA	CTGTGACAGG
1701	GGGTCCCTAC	ACAGCCATTG	TAGGTGAGGG	GTGACTGCTC	TGGCACAAAG	CATCAAGGAA	CACTGGCTTT	ACCTCTGCA	GGAGCACGTA	TGAGGAGCAC
1801	TTATAGTCT	TCAGGAAAGTC	CACAAAACGA	GACTGCATCC	GTTCCAGAAT	CATAATGGAG	CCCAGAGGAG	GGAAAGTACG	CACCACCCAG	TTCTGTCTAT
1901	CTGCCAAAAG	AGAGCAAGAC	ACCTCAGCAA	CAGTGACAAT	TCTAGAGCCT	GCAGGGTCTT	GTCCCAACTG	CTAAGCTCTA	GTTGTCACT	GGTCCACGGT
2001	ACACCTGGGT	GGAGACAGGC	CATCGAAAGT	TGCCACCTAC	CAGCTTCAAC	TCTCATAACG	TAAAGACACC	CCCATGAGGA	ATCAGCGCAA	CGTCCAGCCC
2101	ATAATAAGCC	TTCGTCAATCA	GCCTTGACAT	CGGAAGCGGG	AGTCAATTAC	CTAGTTTCGT	GTAAGGCTTG	AGCAGGGCCC	GGATCTCCCT	CCTGATCGCC
2201	TTCTCACTTT	TCTCGGGTTT	TGGTACCGA	ACCCATTGA	TGCTCAGGTA	AGAGTGGGTG	TAGACAGAAA	AGCATCTTTG	GGGAGGCTGC	CCTTGGTTGA
2301	TGATATGGCC	GATACTCTCC	AACTGGCCGT	AGACGCAAGT	CACACGGCAG	ATCCCACTCA	AAAGTAAACC	CTAGTGTGAA	AAGAAAAAAA	CCATTAAACA
2401	CCCTAACTAG	TGATTTACCT	ATCAAAAAGGA	CTTTTCTTTT	TTTTTCTTTT	TCTTTTTCTT	TTTTTTTTTT	GGTTTTTTCG	GACAGGGTTT	CTCTATATAG
2501	CCCTTGTCTG	CCTGGAAGTC	ACTCTGTAGA	CCAGGCTGGC	CTTGAAGTCA	GAAATTCACC	TGCCCTGCCC	TCCCAAGTGC	TGGGATTAAG	GGCGTGGCCC
2601	ACCATGCCCT	GCTCAAAAAG	ATTTTCTTTT	CTTGATTGAG	GGCCTTAAGA	CTCTGGCTGT	CCCAGAACTA	TGTAGAACAC	AGGACAGGCT	GTTCTTCTTA
2701	TCATTAATAA	CCAACCATCC	CTGCATTGAG	AGTGATGTC	ACCAGCCACA	CCTGACAAGG	AAACCCAAAC	TACACAGCAT	GGAGCCCGCA	ACGGCTGCTC
2801	ATTGGGTAAG	GGCAGTGGCT	GCTCTACTGG	AGATCCCAGG	CCTGTTCTTG	CACACCCATA	TGGCGATTCA	CATCCTTCTA	CGACTATGGT	TTTCAAGTTT
2901	CCAATGCTCT	GTAATAGAAA	GCACTGCACA	TGGCTGTGTT	ACAGAAACGC	AGGCACAACA	TACTCAAAAA	ACCAACAACC	AACTACACC	GTACTAAGTA
3001	GCCAAACATC	GTCAGGTTTG	TTTTTTGTTT	TTTCTGTGTA	TAGCCCTGAC	TGTCCTGGAA	CTCACTCTGT	AGACCAGGCT	GGCCTCAAA	TCAGAAAACC
3101	GCCTGCCCTC	GCTCCCAAAG	TGCTGGGATT	AAAGGTGTGC	GCCACCCAGC	ATCTGTCAAG	TTTTTAACCT	AAACCCAAAC	AAAGTACCTC	CAGTGCAGCT
3201	CCCAACACGC	TCTCACACCC	GATGCTTGGG	AAGGCTCACA	GCGAGCTTGA	GTCTCCAATT	CCTGAGGCTT	CGCTTCTTGA	CATGACAGGG	GCAATGTCCC
3301	CGACCGGAGT	CCACGTGAGA	CTGCCCTCCT	TTGCCCTCTG	GCTCTGCCCT	GGCTAGTGTG	TAACTCTGTG	CAAGTTACTT	ATTTTGTCTT	TCGGCCCATC
3401	GACACGGGAA	AGACATGGCA	GCGGTCACTC	CCGTGAGAGG	AGGGGGCTTT	AAATGGTTTC	GAACACCTGG	ATCGCTGGGG	GTTTAAAGTC	CACTAAGTCC
3501	GACCCCATTA	GCTTGTCTAG	AGTAGAGGCT	CCGGAGCAGG	AGGACGAGGA	CGGGCTTGCA	TCCGACCTGC	ATCCGGAGGC	TCACCCGGCAG	CGCCCCGCTG
3601	ACCACCTACC	TCTCCCGGGC	GCAGCATCAT	CAACACGCGG	CCCGAGCCCA	GGTCCCGCAC	GGGCTGGGGT	ACGTTCCGGG	ACACCTTCCG	CACGGGGCGC
3701	CCGGCCCGGC	TCTGGGGCGT	GGAGTGGTTG	CGGGGTTTGA	GCAGGCTGCA	GCTCGCGGAC	GCGGTGCATG	GCGCGGGCGG	GACGCTCGGT	GTGGGCGGGC
3801	TGGGGGGGCG	CAGCCGGGCT	GCGGCCCCGA	GTTTGCATCT	TAGCCGACCA	TGGCGGCGCG	GCGGGGGGAC	CTGCTTCCAG	TCCCGGCTCA	ACGGGTGTGC
3901	CCGCAGCAGC	CCCGGTGCGA	GCGGTGCGAG	CTCGACTCGG	GTCAGGAACC	CAAACCGAGC	GCGGCCCCGG	CGGCTGAGGA	GGAGGTGGG	CGGGCTTTG
4001	CGTACCAGCA	GCCAGGAAGA	GCGGCTCGGA	GCCCGCCGGT	GTAACACCTC	CGACTCCGCC	ATGCTTGTCC	CGGAACCCCT	CCGGCGGGAC	GATCTCGCGA
4101	GACCGGCTCA	CCCCGCCCCC	AGCGGAAGAG	CAGCGGGGCG	GCTGGCGCCC	CCTCCCGGGC	GGCGTCTGCA	GCGCATCATC	GGTGACTTCA	GCCTCAAGTT
4201	GCCCGGAGAG	AAGCTTGGAG	GTCCCAACCA	GAGCCCTATT	TACATTATGC	AAAAGCCAC	CCTGCCGGGT	TGGAGACAGG	AGAGCCAAAC	CTCCTGGATT
4301	TACCACCCAG	GCCACCTCTC	AGGAAATCCA	CCTGGGATTT	TTTTTCTCTT	CCTGCAGATA	AAACAAAAAA	CCAAAACCTT	CCAGGATTTG	CATTTTAAAC
4401	AAATCAGGTG	CATTTGTGTA	TGCTGTGTTT	GCATACATTT	GTCTTCTGGC	TGATGGGCAT	GATCCAGGAC	AAAAGGTTTA	AACCATGACG	ATTAGCTCAC
4501	ACTTTGATGT	CTGAATACTG	GGTCAACCGC	AAAGCCTGGT	TTCAAGTTTA	CTAAATGAGT	TTTACTGTGT	TCTGTAACCT	TTGCTGACAT	CAGCTAACAG
4601	TACTATCAGT	TACTCCGATG	AATGAGGTAG	GAGGATGGCT	TGAGCCCTGG	AGTTAGTTCA	AAACACGCTT	CAAGAGAACA	CTTCAAAAAA	AAAAACAGAA
4701	CAAGCCATCA	GGTCCAGAT	GCCACAGCCA	TCCCTCTCTC	CTCCCTTAAA	ACCAGCAGGC	CTCCCTTCTT	GAGACAGGTA	GACCTACAGCA	AGGACGGAAA
4801	CCACAAGCGT	CCAGGAGTGT	GGGTCTCAGG	AATCCACCTG	GTTTCCATCC	ACCTGCTGGC	CCTGCCAGT	TCTGAGAGA	AGCCAGAGCC	CGGAAGGAAA
4901	ACAGCCCTTC	CACAACCTGG	CTCCAGTCCC	ACCCCTTTCA	GCGGCAACA	GTTATGAAGC	GTCTGGGCGG	CTGCTTCCAG	TCCCGGCTCA	TGTGCTCAGC
5001	CATGCTGGAC	AGAGGGACGT	CGCCACCATG	AATGGCACAG	AAGGCCCTAA	CTTCTACTGT	CCCTTCTCCA	ATGCGACGGG	TGTGGTACCG	AGCCCTTTCG

5101	AGTACCCACA	GTA	CTACTACCTG	GCTGAGCCAT	GGCAGTTCTC	CATGCTGGCC	GCCTACATGT	TTCTGCTGAT	CGTGCTGGGC	TTCCCCATCA	ACTTCTCTAC
5201	GCTCTACGTC	ACCGTCCAGC	ACAAGAAGCT	GCGCACGCCCT	CTCAACTACA	TCCTGCTCAA	CCTAGCCGTG	GCTGACCTCT	TCATGGTCCCT	AGGTGGCTTC	
5301	ACCAGCACCC	TCTACACCTC	CTGCGATGGA	TACTTCGTCT	TGGGGCCAC	AGGATGCCAAT	TTGGAGGGCT	CTTTGGCCAC	CATGGGGGGT	GAAAATGGCC	
5401	TGTGGTCCCT	GGTGGTCCGT	GCCATCGAGC	GGTACGTGGT	GGTGTGTAAG	CCCATAGACA	ACTTCCGCTT	CGGGGAGAAC	CATGCCATCA	TGGGGCTTGC	
5501	CTTACCTGG	GTCATGGCGC	TGGCCTGCGC	CGCACCCCCA	CTCGCCGGCT	GGTCCAGGTA	CATCCCCGAG	GGCCTGCAGT	GCTCGTGTGG	AATCGACTAC	
5601	TACACGCTCA	AGCCGGAGGT	CAACAACGAG	TCTTTTGTCA	TCTACATGTT	CGTGGTCCAC	TTCACCATCC	CCATGATTAT	CATCTTTTTT	TGCTATGGGC	
5701	AGTCTGCTTT	CACCGTCAAG	GAGGCGCGTG	CCCAGCAGCA	GGAGTCAGCC	ACCACACAGA	AGGCAGAGAA	GGAGGTCACC	CGCATGTGTA	TCATCATGGT	
5801	CATCGCTTTC	CTGATCTGCT	GGGTGCCCTA	CGCCAGCGTG	GCATTCTACA	TCTTACCCCA	CCAGGGCTCC	AACTTCGGTC	CCATCTTCAT	GACCATCCCA	
5901	CGCTTCTTTG	CCAAGAGCGC	CGCCATCTAC	AACCTGTCA	TCTATATCAT	GATGAACAAG	CAGTTCGGGA	ACTGCATGCT	CACCACCATC	TGCTCGGGCA	
6001	AGAACCOCAT	GGGTGACGAT	GAGGCCTCTG	CTACCGTGTG	CAAGACGGAG	ACGAGCCAGT	TGGCCCCGGC	CTAACTCGAG	ATGTTTAAAT	AAGAATTCGG	
6101	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CTCCCTCCCC	CCCCCTAAC	GTTACTGTGC	GAAGCCGCTT	GGAAATAAGC	CGGTGTGCGT	TTGTCTATAT	GTTATTTTTCC	
6201	ACCATATTGC	CGTCTTTTTG	CAATGTGAGG	GCCCGGAAAC	CTGGCCCTGT	CTTCTTGAGC	AGCATTCCTA	GGGGTCTTTC	CCCTCTCGCC	AAAGGAATGC	
6301	AAGGTCTGTT	GAATGTCGTG	AAGGAAGCAG	TTCCTCTGGA	AGCTTCTTGA	AGACAAAACA	CGTCTGTAGC	GACCCTTTGC	AGGCAGCGGA	ACCCCCACC	
6401	TGGCGACAGG	TGCCTCTGCG	GCCAAAAGCC	ACGTGTATAA	GATACACCTG	CAAAAGCCGC	ACAACCCAG	TGCCACGTTG	TGAGTTGGAT	AGTTGTGGAA	
6501	AGAGTCAAA	GGCTCTCCTA	AGCGTATTCA	ACAAGGGGCT	GAAGGATGCC	CAGAAGGTAC	CCCATTGTAT	GGGATCTGAT	CTGGGGCCTC	GGTGCACATG	
6601	CTTTACATGT	GTTTAGTCGA	GGTTAAAAAA	ACGTCTAGGC	CCCCCGAAC	ACGGGGACGT	GGTTTTCTT	TGAAAAACAC	GATGATAATA	TGCCACAAC	
6701	CATGGTGAGC	AAGCAGATCC	TGAAGAACAC	CGGCCTGCAG	GAGATCATGA	GCTTCAAGGT	GAACCTGGAG	GGCGTGGTGA	ACAACCACGT	GTTCAACCATG	
6801	GAGGGCTGCG	GCAAGGGCAA	CATCTGTTC	GGCAACCAG	TGGTGACAT	CCGCTGACG	AAGGGCGCCC	CCCTGCCTTC	CGCCTTCGAC	ATCCTGAGCC	
6901	CCGCCCTCCA	GTACGGCAAC	CGCACCTTCA	CAAAGTACC	CGAGACATC	AGGCATCTCT	TCATCCAGAG	CTTCCCGCCG	GGCTTCGTGT	ACGAGCGCAC	
7001	CTTGGCCTAC	GAGGACGGCG	CGCTGGTGA	GATCCGACG	GACATCAACC	GATGTCGAGG	GATGTTCTGT	TACCCGCTGG	AGTACAAGGG	CCGCAACTTC	
7101	CCCAACGAGC	GCCCCGTGAT	GAAGAAGACC	ATCACCGGCC	TGCAGCCGAC	CTTCGAGGTG	GTGTACATGA	ACGACGGCGT	GCTGGTGGGC	CAGGTGATCC	
7201	TGGGTGACCG	CCTGAACAGC	GGCAAGTCTT	ACAGCTGCCA	CATGCGCAC	CTGATGAAGA	GCAAGGGCGT	GGTGAAGGAC	TTCCCCGAGT	ACCATTCTAT	
7301	CCAGCACCGC	CTGGAGAAGA	CCTACGTGGA	GGACGGCGGC	TTGCTAGAGC	AGCACGAGAC	CGCCATCGCC	CAGCTGACCA	CGCTGGGCAA	GCCCCTGGGC	
7401	AGCCTGCACG	AGTGGGTGTA	AGCTCGAGCA	TGCATCTAGA	GGGCCCTATT	CCCTTTAGTG	AGGGTTAAT	GCTAGAGCTC	GCTGATCAGC	CTGACTGTG	
7501	CCTTCTAGTT	GCCAGCCATC	TGTTGTTTGC	CCCTCCCCCG	TGCCTTCTTT	GACCCTGGAA	GGTGCCACTC	TCACTGTCCT	TTCCATAATA	AATGAGGAAA	
7601	TTGCATCGCA	TTGCTGAGT	AGGTGTCATT	CTATTCTGGG	GGTGGGGTG	GGGCAGGACA	GCAAGGGGGA	GGATTGGGAA	GACAATAGCA	GGCATGCTGG	
7701	GGAGATCTGT	TTAAACTGCT	CTCGAGCTCG	GAAAAGCTTA	TAACCTCGTA	TAGCATACAT	TATACGAAGT	TAT			

ACN-Selektionskassette (einzeln aufgeführt)

11401	GGGAGGAGG	GGGAGGAGG	ATAA	CTTCGTATAG	CATACATTAT	ACGAAGTTAT	GAATTCATCG	ATATCTAGAT	CTTCCGCTGG	GGCTGTTGAG	AATGGGCAGA
11501	TGAGATGGGC	TGAAGGTGGC	GGGTCTGAGT	GGCGGGAGAG	CTTGAGGTGT	CTGGGAGAGC	TCAGCCACGG	CTTGCCATGT	ATAAGCACAC	AGAAGGATCC	
11601	AGTGCATAAA	AGACGTGAAA	CGTGTGTGTG	TGGCTTCTTG	GCTACTATTG	CGGTCTGGGG	ACAGCTTGGG	ACCGCACACC	AACTAGCTGG	AGTAGGAGCC	
11701	TAGCGCCAG	CTTGGCGTTA	CTAGCGGACT	CGGGACCCAG	CGCGGTTGGA	TTTACCCTTG	GTCCCGGCC	CTATGTCTGC	CATTGGTCTC	TTTCTGAGCC	
11801	TCCGCTTTG	AGCGGGGACC	CGAGACATT	CGCCACGGA	GGGCTCCGGT	TCTTGCCTGC	GCGCCTGTAT	GTCACATCCG	GCGCGGCGCC	GGTGGCGTCT	
11901	CCGCGCTGTG	GGCCGGGACG	TAGTTAGTCT	TGTGGCGGGT	GAAAGTGGTC	TAGCCCGGAG	CAGTGAAGCC	GGTGTGAGCC	GGGAGGACCG	CGGGGGTGTG	
12001	GAGGTGCGG	GAGGGAGGTG	GAGAGCCGCC	TGGGCTCTC	AGGAGCGTGT	GGCCCGCCGC	TTCCGCTTGC	CGCCCGCCCG	CGATGTGACG	CGCGGCGGTG	
12101	GGCTTGGGTC	ACCTGTGGCG	AGCCCGCCGC	CTGCCCTACT	GGCTGTCCGT	TGGGTGCTCT	ACAGATCAGC	TGTCGTCCAC	GCTGGTCTAG	CCCCAAACTC	
12201	TCATTTTCAT	TTTTTCCCA	CCAGCACCTT	ATCCCGACTA	CCCTGTCTCT	GTCTCCCGCC	ATGCATCTCC	TCTCCGCTC	TCTCCCTCC	GGCAACCCCA	
12301	TGCGGCTCCC	CGCCCCAAG	ACTCCACTCT	GGCTGTGTGC	TCCGTGTGCA	CTTCTAAC	TTGACCCAAG	CCTGCATCCC	GACATGGGTG	GATGTGCAAG	
12401	TGTCCATCTC	ACTCTCGGTC	CAAAAAGGCT	TTTCCGATTG	GGGCTGAGCA	GAGGGGTTCAT	GTTTGCTTC	CCTTTCAGAT	TATGGACGGT	TCCTTCGTGC	
12501	AGCACAGCGT	GAGGGTCTCG	CAGGAATCA	ACAAGCAGCG	CGAGAAGGCG	CAGTATTGGC	ACGCCACACT	GGACGTGGGG	GGCCTGGTGT	TCAAGCGGCA	
12601	CTGGAGTGTG	CTGGCGTGT	GCAGCCATT	CTTCCAGGG	ATCTACGGGG	ATGGCACAGG	GGGCAGCGTT	GCTCTCCAG	CGGGCTTTG	TGAGATTTTT	
12701	GGCCTCCTGC	TGGACTTTTT	CTACACCGCC	CACCTCGCCC	TCACCTCAGG	CAACAGGGAT	CAGGTAATCT	TGGCAGCCAA	AGAGTTGCGG	GTCGCTGAGG	
12801	CTGTGGAGCT	ATGTACAGAC	TCCAGCCCC	AAACCTCAGT	GGGACAGGCA	CAGAGTGGAC	TGGGTCAACC	TGCCTCCAG	GACGTGAAA	GCCACCTGAA	
12901	GGAGCCGACA	GACTTGGATG	AGGAGGAAGT	TTTCAGGACT	CTGAGCCTGG	CCTCCGTGGA	TCAGGAGCCC	AGAGACACTG	AGCACCCCCA	GCTGGGTACA	
13001	CCTGCTCAGA	GCACCACGAC	CTTCTCTGT	GGGAACTCA	CGCAGGCTTT	GAAGCCTTCT	CCCTCAGAGG	ACAAAAGATC	TGAGGACTGC	AAAGACCCCC	
13101	CAAGGCCCTT	CGAGGCTGGA	GGTGCCCGC	TGCAGGGCGA	GAGCAATGAG	GTAATGTTTT	CAGGGAACCTG	GGGAGGCAAG	CATAAGGGTA	AAGACCGACA	
13201	CTTCCGGAGC	AAACATGGGA	AGCCAGTGGT	CTCAGCTGAC	CTTCTGCGAG	CTACACTTGT	CCATGGTTGC	CAGCTTCTT	GGGGTGGAGT	GAGCGTCAAG	
13301	GTTACAGGTA	TTTCTTAGG	TTAGTGATCC	TGGCCAGCTC	CCTGCTAACA	TAGCCACTGT	GCTCCAAGTC	CAAGATTGCA	GTCCTCTCTG	GGCCCTGCAG	
13401	GGAACTGTTG	TCTCTGGTGA	ACGGACCATC	TGGGGGTGGG	GCTTATGTTG	GAACGTAAAG	CTGGTCTCTG	CTGATACCTG	GGTACCCTTA	CCCCCTCCTG	
13501	CTGCCCTCTC	TGCTCTAGTG	GGAAAGTGGT	GTCCAAGTGG	AGGACGACAG	GGACGGTGT	TACGTATCTG	AGCCTGAGAC	TGTGCTGACC	AGAAAGGAAGT	
13601	CAAAAAGTGT	TAGAAAACCC	TGTGCAAGCG	AGCCAGCCCT	GGGTGCGGGT	TCTCTCACAG	CCGAGCCAC	TGACAGCAGA	AAAGGTGACG	CCGTTCCGGT	
13701	CGAATGTCTC	ACATGTCACA	AAAAGTTCCT	CAGCAAAAT	TGAAAAAGGA	AGAGTATGAG	TATTCACAT	TTCCGTGTCG	CCCTTATTCC	CTTTTTTGGC	
13801	GCATTTTGCC	TTCTGTGTTT	TGCTCACCCA	GAAAACGCTGG	TGAAAAGTAAA	AGATGCTGAA	GATCAGTTGG	GTGCACGAGT	GGGTATACAT	GAACTGGATC	
13901	TCAACAGCGG	TAAGATCCCT	GAGAGTTTTT	GCCCCGAAAG	ACGTTTTCCA	ATGATGAGCA	CTTTAAAGT	TCTGCTATGT	GGCGCGGTAT	TATCCCGTAT	
14001	TGACGCCGGG	CAAGAGCAAC	TGGTGGCGG	CATACACTAT	TCTCAGAATG	ACTTGGTTGA	GTAATCACCA	GTCACAGAAA	AGCATCTTAC	GGATGGCATG	
14101	ACAGTAAGAG	AATTATGCG	TGCTGGCATA	ACCATGAGTG	ATAACACTGC	GGCCAATTA	CTTCTGACAA	CGATCGGAGG	ACCGAAGGAG	CTAACCGCTT	
14201	TTTTGCACAA	CATGGGGGAT	CATGTAACCT	GCCCTGATCG	TTGGGAACCG	GAGCTGAATG	AAGCCATACC	AAACGACGAG	CGTGACACCA	CGATGGCTGT	
14301	AGCAATGGCA	ACAACGTTGC	GCAAACTATT	AACTGGCGAA	CTACTTACTC	TAGCTTCCCG	GCAACAATTA	ATAGACTGGA	TGGAGGGCGA	TAAAGTTGCA	
14401	GGACCCTTC	TGCGCTCGGC	CCTTCCGGCT	GGCTGGTTTA	TTGCTGATAA	ATCTGGAGCC	GGTGAAGCGT	GGTCTCGCGG	TATCATTGCA	GCACTGGGGC	
14501	CAGATGGTAA	GCCTCCCGT	ATCGTAGTTA	TCTACAGAC	GGGGAGTCAG	GCAACTATGG	ATGAACGAAA	TAGACAGATC	GCTGAGATAG	GTGCCTCACT	
14601	GATTAAGCAT	TGTAAGTGT	CAGACCAAGT	TTACTCATAT	ATACTTTAGA	TTGATTTAAA	ACTTCATTTT	TAATTTAAAA	GGATCTAGGT	GAAATCCCTT	
14701	TTTGATAATC	TCATGAGGCG	CGCCTCATGA	CCAAAATCCC	TTAACGTGAG	TTTTCTGTCC	ACTGAGCGTC	AGACCCCGTA	GAAAAGATCA	AAGGATCTTC	
14801	TTGAGATCCT	TTTTTCTGC	CGGTAATCTG	CTGCTTGC	ACAAAAAAC	CACCGCTACC	AGCGGTGGTT	TGTTTGGCCG	ATCAAGAGCT	ACCAACTCTT	
14901	TTTCCGAAGG	TAACCTGCTT	CAGCAGAGCG	CAGATACCAA	ATACTGTCTT	TCTAGTGTAG	CGGTAGTTAG	GCCACCACTT	CAAGACTCTT	GTAGCACCGC	

15001 CTACATACCT CGTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCCTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA
 15101 GGCGCAGCG TCGGGCTGAA CCGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA
 15201 AGCGCCACGG TTCCCAAGG GAGAAAAGCG GACAGGTATC CGTAAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAACGCCT
 15301 GGTATCTTTA TAGTCCCTGC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGAAAAA ACGCCAGCAA
 15401 CGCGGCCCTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG C

Targeting-Vektor Tas1r2^{Opisn mws}

DTA-Fragment 261-837 bp
 Tas1r2-5'-Fragment 1205-2358 bp
 Opisin mws 2364-3443 bp
 ACN-Kassette 3445-7193 bp
 Tas1r2-3'-Fragment 7208-9222 bp
 Amp R 9326-10113 bp

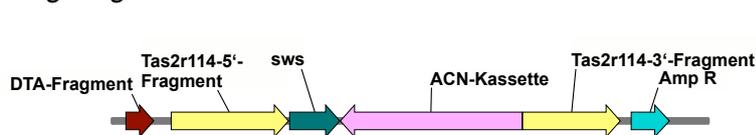
1 ACGGACCGAA CAACTCCGCC GCGCGCCTC CGTGTAGGCC GGTGCGGGCG GCCCCGTAGC GCAAGGGAGG GCGGGAAAAG AAGGGGCGG ACACAAGGGC
 101 GAATCTATAA AGGGCGTAC TCAGCCAGTT CTCTCCTCAG AAGCGCCGAG AGCGCGACCG GGACGGTTGG AGAAGAAGGT GGCTCCCGGA AGGGGAGAG
 201 ACAAACTGCC GTAACCTCTG CCGTTCAGGA TCTGCGACCT GCAGGTCTCC GCCATGGACC CTGATGATGT TGTGATTCT TCTAAATCTT TTGTGATGGA
 301 AAACCTTTCT TCGTACCACG GGAATAAACC TGGTTATGTA GATTCCATTC AAAAAGGTAT ACAAAAGCCA AAATCTGGTA CACAAGGAAA TTATGACGAT
 401 GATTGGAAAAG GGTTTTATAG TACCGACAAT AAATACGACG CTGCGGGATA CTCTGTAGAT AATGAAAACC CGCTCTCTGG AAAAGCTGGA GCGTGTGTC
 501 AAGTGACGTA TCCAGGACTG ACGAAGTTTC TCGCACTAAA AGTGGATAAT GCGGAAACTA TTAAGAAAAG GTTAGGTTTA AGTCTCACTG AACCTGTGAT
 601 GGAGCAAATC GGAACGGAAG AGTTTATCAA AAGGTTCCGT GATGGTGCTT CCGGTGTAGT GCTCAGCCTT CCCTTCGCTG AGGGGAGTTC TAGCGTTGAA
 701 TATATTAATA ACTGGGAACA GCGGAAAAGC TTAAGCGTAG AACTTGAGAT TAATTTTGAA ACCCGTGGAA AACGTGGCCA AGATGCGATG TATGAGTATA
 801 TGGCTCAAGC CTGTGCAGGA AATCGTGTCA GCGGATCTCT TTGTGAAGGA ACCTTACTTC TGTGGTGTGA CATAATTGGA CAAACTACCT ACAGAGATTT
 901 AAAGCTCTAA GGTAATATA AAATTTTAA GTGTATAATG TGTAAACTA CTGATCTAA TTGTTGTGT ATTTTAGATT CCAACCTATG GAACTGATGA
 1001 ATGGGAGCAG TGGTGGAAAT CAGATCCACT AGGATCTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAA
 1101 AAAGCATTTT TTCTACTGCA TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA AACTCATCAA TGATCTTAT CATGTCTGGA TCGTAGTTCT AGAGCGGACC GGTAAAACGA
 1201 CCGAAATTTA TTTAACTTTA TTTATGAATA CACTGTCACT GTCTCCAGAC ACACCAAGAA AGGGCATCGG ATTCCGTTAC GGATAGTTGT GAGCCACCAT
 1301 GTGGTTGCTA GGAATTGAAC TCGGACCTC TGGAAAGACA GTCACCTGAGC CATCCCTCCT GCCCAAGAG CAATGATTCT TTGCAGTTTG TAGGTTATGG
 1401 TGCATCTTGG AGAGGAGTTA TGGCAGCTGC CCAAGGGCAG CATCTCCTAG AGTGAGCCAA TCAAGAAAAA TGCCCTAGAG ATCTCCCCAT AGGCCAGTGT
 1501 GATGGAGGCA ATTCCACATC TGAGGCCCT CTTTCCAGAT GACTATGTC AAGTTGACAAA AACTAACCAG CACCCGTGAT AGCCAAGGCT CCACCTCTG
 1601 AGTGCTGGGA TGCCAACTCT GCATCACCAC ATCCAACCAG TCTTGAGATG TCTTAAACATC CCATGAGGCA GAAAGTAGA CTTAGCTTGT GGGGAACCAG
 1701 AGCAGACCTC TCCAATACTC TGCCAGTGT CTGCACAACG GTAGACTTGC TTACAGGCTC TGCCATTAAG AGTCCACCCC TCTGCATCTC AAGGCAGTCC
 1801 AGAGCCCACT GTGTGCAGGA GGAGGGGAGG GGAGGGGAGG AGACAGACA GAAGACATAC AAGAGGGTAT AGGGGTACA AGGGCACATC GAGGAAGGTG
 1901 GTTGGGAAAG GAGCTTGGGA TACCCAGTC TCCTCTACCC ATTGGGTGGG TGGGGGCTGC TCTGGGCTGC ATACCAGGTG TATGCCAAGG GAGACACCAA
 2001 ATGAATGGAT GAGGCTGGG TCACTGTGAC CATGGCTGTC TCCTCTGCCT GCCTTTGTGT GACCACCATG GCTGACTGCC ACCTTCACAG CCAATGGCCA
 2101 CACAGTATG AGCTCAGGCA GAAGGCTGGG TGCAGCGAGC TAAAAAATTG CATGTTCTCC CAAGCCATGC AGGCCCACT GGGCCCAACA AATATATCTC
 2201 GCTCCAGTCT CTGTTCCCTG CCTGGAGCCC TTAAGGATGT CCGCTAATCC CCGGGCAGGA TCGTCACTAT GTAAAATGCT GTGCAAAATG TTAGCTGTGG
 2301 GGTGACCGGC TCCACAATGA GGCTGGGCAT CGTCTAAGGC TGTACTTGG CTGGCGACC ACCATGGCCC AAAGGCTTAC AGGTGAACAG ACACTGGACC
 2401 ACTATGAGGA TAGCACCCAT GCAAGCATCT TCACCTATAC CAACAGCAAC AGCACCAAGG GTCCCTTTGA AGGCCCAAT TATCACATTG CTCCCAGGTG
 2501 GGTGTACCAC CTCACCAGCA CCTGGATGAT TCTTGTGCTC GTTGCATCTG TCTTCACTAA TGGACTTGTG CTGGCAGCCA CCATGAGATT CAAGAAGCTG
 2601 CGCCATCCAC TGAAGTGGAT TCTGGTGAAC TTGGCAGTTG CTGACCTAGC AGAGACCAAT ATTGCCAGCA CTATCAGTGT TGTGAACCAA ATCTATGGCT
 2701 ACTTCGTTCT GGGACACCCCT CTGTGTGTC TGAAGGCTA CATTGTCTCA TTGTGTGAAA TCACAGGCCT CTGGTCCCTG GCCATCATT CTGGGAGAG
 2801 ATGGCTGGTG GTCTGCAAGC CTTTGGCAA TGTGAGATTT GATGCTAAGC TGGCCACTGT GGGAACTGTC TTCTCTGGG TCTGGGCTGC TATATGGACG
 2901 GCCCCACCAA TCTTTGGTGG GAGCAGGTAC TGGCCCTTAT GCCTGAAGAC ATCCTGTGGC CCAGAGCTGT TCAGCGGTAC CTGCTACCCC GGGTTCAGT
 3001 CTTATATGAT GTTCTCATG GTCACGTGCT GCATCTTCCC ACCTAGCATC AGTGTGCTCT GCTACCTCCA AGTGTGGCTG GCCATGCCAG CAGGCTGAAA
 3101 GCAACAGAAA GAATCTGAGT CCACTCAGAA GGCCGAGAAG GAGGTGACAC GCATGTTGTT GGTGATGTT TCGCATACT GCCTCTGCTG GGGACCCAT
 3201 ACTTCTTTG CATGCTTTG TACTGCCAC CCTGGCTATG CCTTCCACCC TCTTGTGGCC TCCCTACCAT CCTACTTTG CAAAAGTGGC ACTATCTACA
 3301 ACCCATTTAT CTATGCTTTT ATGAACGGG AGTTTCGAAA CTGCATCTTA CATCTCTTTG GAAAGAAGGT TGATGATAGC TCTGAACTTT CCAGCACCTC
 3401 CAAGACAGAA GTCTCATCTG TCTTTCAGT GTCACCTGCA TAAAGATCTC GAGCTCGCGA AAGCTTATAA CTTCGTATAG CATACATTAT ACGAAATTT

ACN-Selektionskassette (einzeln aufgeführt)

7101 GTTGGCTGT TTTTCCGAT CAGTCCCTG ATGAGCAAT TAAACTTC GTATAGCATA CATTATACGA AGTTATGAAT TCATCGATAT CTAGATCTGG
 7201 GCGCGCCACC CACCGCCTCA GCAGCAGAGC CCCCAGCCAC GCTCCCGGTG TTCTTGTTC CTCAGCATTC TTTGCAGTGT AGCTATTTTT TTTACCCACA
 7301 TAGCTCTTGA AATTACCAT AATGCATCC CACTGCCCCC TCCTCCAATC CCGAACCACC GCCCGAGCGG GGGGTTCACT GGCTAGGACC TACCACCCAC
 7401 TTATGGAAAG AACCACCAAG GTGACCTATG TGCTCTCAAG GATGGCCACC CACTGCCATC TGGTGGCCAT AGAGAGCAC TGGGGGGCTG TGGCCCATGC
 7501 CTTCTGCTC ATGGCTAGTG TGGCTGTGAG ACCAACCATG GTGGCTACTG TGCTCTCCAG ATGTCTGTTA ATCTGTGTTT CATTCCGGTT CCTGGGGAGC
 7601 ACAGACTGGG ACTCCTGTGT TCTAATGGTC AGATGAGCAT CATGGTCTCT CCATTGTTGC TTATGAATAA ATTTCCCTTG GGTGAAATCA ATGTCCCTTC
 7701 CTGATTCAG AGATTTCCCT AGGAAGTCA GAGACTCAGT CTGGGCATTC ATTGTGTCTG GGTGACCTTG GCCCAACTTG TCTTTGAGCC TCCACTTGCC
 7801 CATCTCTGAA ATGGGCATCA TAGTTGCAGA TGTGATGTT TGGAGGCTGA AGAAATGGAA GCTGGGACGA GTCACCCCTC CGGAGGAGAT ATGGGGAGAG
 7901 TCACGCATG GTTGCAATTG ACAGCCATGA TGGAGCCCTG GATGGGGAGA GAGAGCCTTT GAGGCTTAA GAGGACTTCC TTAAGAGAGA AAAGCACCAT
 8001 AGATAGCAAT GACAGGGGGC TGTAAGAGAC TGAATCTTCA CTTCTATGGA ACAAAGGGGG TTCCATATCC CAGGGTGTGT GTATACACTA TCCAGGGAAA
 8101 TACACTCTCC GATGTGTTAT CTCGGCTACT TGCCAGGAAT CCCAGGGCAG AAAGGCATA GACAAAAGTG AAGTTATAAT GCAAGGTTGT TTTAGGCGCTG
 8201 GGCATCAGGG GCCTGGGCTC CCGATTGCAG GGAGGAGGA GTCTTTGAGA TCATAGCAGC TTTGCTGAGT GAGCTGTGGG GAGATATGGT CTGATTACAG

8301	AGAAAGAGAG AGAGCGCGCA TAACACAACA AGAATCCATG ATAGAACAACA AGAAGGTAAA AATGTACACA GTGGGTACGC AATAAATGCC AGTCACTATA
8401	AATTCACATG CTCTGAAAC CATCAGGGCA ATGTAAGATT GTGCTTTGTG TGTGTGTGTG TGTGTGCACA TGTGTGTGCA GCTGAACCTA TACTTGTGTG
8501	TACATGCATG TGGAGGCCAG AGGAAAACAT TAGGCACAT TTATCAGAAA CCATAGGGTG ATAGAGAGAT GAAATCTCTT ATGGGCGTGG CACTGGCTGA
8601	TGGGCTAGGC TGGAGGCCAG TGAGCCCCAA GCATCTGTCT TGCCCATCTA CAAGCACAGG CCGCCATGCC TGGTGTGAAG GTATGAATGG GAACAGCCCC
8701	CCATGCACAT ATATAATTGA ATACCTGGCC GCCAGTTGGT GGAACCTCTT GGGAAAGTTT AGGGGGTGTG GCCTTGGAGG AGGTGTGTCA CTGGGGGGCA
8801	GGCTTTGAGG TTTCAGAAAG CCAGGCCACC CTAACACTTA GCATTCTCTG TTTTGTCTGT GGTCTCAGCT TCTGCTCCAG CTTCAGGTCT GCCTGCCTCT
8901	GCTATAATCT TCACCATGGC GGTTCATGAC TCTGCTGCC ATCAGAAATCT TAAAAAATAA AGATTACTT ATTTTATTAT ACATTTGGTGT TCTACCTGCA
9001	TGTTGGTCTG TGTGAGGGTG TCAGATCCCC TGGGCCAGAA TTACAGTTCC AAGTGGGTGC TAGGACAGTC ATGAGCTTCC AAGTGGGTGC TGGGAATTGA
9101	ACCCAGGTCC TTTGGAAGAG CAATCGGTGC TCTTAACTGC TGAGCCATCT CTCCAGCCCT CCACCCCACT GTATCAGGCT GGGGCACCCC TGGTGAGTGA
9201	GGTCCACAT CCAAGTCAA AGGGATCCGT TTAACAATA TTGAAAAAGG AAGAGTATGA GTATTCAACA TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CTTTTTTTGC
9301	GGCATTITGC CTTCTGTTT TTGCTCACCC AGAAAACGCTG GTGAAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG TGGGTTACAT CGAACTGGAT
9401	CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT CGCCCCGAAG AACGTTTTCC AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGTATG TGGCGCGGTA TTATCCCGTA
9501	TTGACGCCGG GCAAGAGCAA CTCGGTCCGC GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGGTTG AGTACTCACC AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT
9601	GACAGTAAAG GAATTATGCA GTGTGCCAT AACCATGAGT GATAACACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG GACCGAAGGA GCTAACCGCT
9701	TTTTTGACAC ACATGGGGGA TCATGTAATC CGCCTTGATC GTTGGGAAAC GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA CGGTGACACC ACGATGCCCTG
9801	TAGCAATGGC AACAACTGTG CGCAAACTAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC GGCAACAATT AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAAGTTGC
9901	AGGACCACCT CTGCGCTCGG CCCTTCCGGC TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGGTCTCGCG GTATCATTGC AGCATGGGG
10001	CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACAGA CCGGGAGTCA GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCTCATC
10101	TGATTAAGCA TTGTTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA AACCTTCAAT TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT
10201	TTTTGATAAT CTCATGACCA AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCAGTAAA AAGATCAAGG GATCTTCTTG AGATCCTTTT
10301	TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAAACA AAAAAACCAC CGTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA
10401	CTGGTTTCTG CAGAGGCGAG ATACCAATA CTGTCTCTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC ACCACTTCAA GAACCTGTA GCACCGCCTA CATACCTGCG
10501	TCTGCTAATC CTGTTACCAG TGGCTGCTGC CAGTGGCGAT AAGTCTGTCT TTACCGGTTT GGACTCAAAG CGATAGTTAC CGGATAAGGC GGAGGGTCTG
10601	GGCTGAACGG GGGGTTCTGT CACACAGCCC AGCTTGGAGC GAACGACCTA CACCGAACTG AGATACCTAC AGCGTGAGCA TTGAGAAAAG GCCACGCTTC
10701	CCGAAAGGAG AAAGGCGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGACG GGTCCGAAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT TCCAGGGGGA AACGCTCTGT ATCTTTATAG
10801	TCCTGTCGGG TTTCCGACC TCTGACTTGA GGTGCGATTT TTGTGATGCT GCTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGAAAAACG CCAGCAACGC GGCCTTTTAA
10901	CGTTCTCTGC CTTTTTGC

Targeting-Vektor Tas2r114^{Opisn sws}



DTA-Fragment	261-837 bp
Tas2r114-5'-Fragment	1192-3612 bp
Opisn sws	3637-4677 bp
ACN-Kassette	4679-8427 bp
Tas2r114-3'-Fragment	8442-10460 bp
Amp R	10681-11468 bp

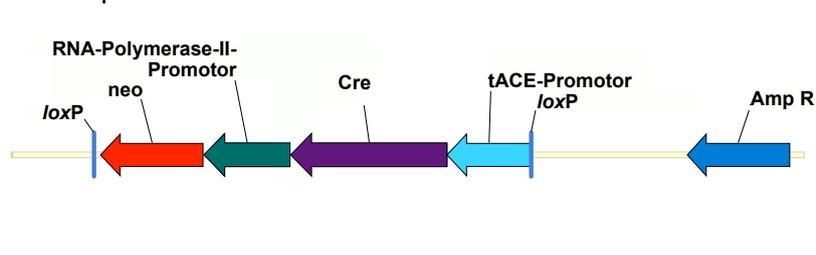
1	ACGGACCAGAA CAACTCCGCC GCGCGCGCTC CGTGTAGGCC GGTGCGGGCG CCCCCTAGC GCAAGGGAGG GCGGAAAAGG AAGGGGCGGG ACACAAGGGC
101	GAATCTATAA AGGGCGTCC TCAGCCAGTT CTCTCCTCAG AAGCGCCGAG AGCGCGACCC GGACGGTTGG AGAAGAAGGT GGCTCCCGGA AGGGGAGAG
201	ACAAAATGCC GTAACCTCTG CCGTTCAGGA TCTGCGACCT GCAGGTCCTC GCCATGGACC CTGATGATGT TGTGATTTCT TCTAAATCTT TTGTGATGGA
301	AAACTTTTCT TCGTACCACG GGAATAAACC TGGTTATGTA GATTCACATC AAAAAAGGTAT ACAAAAAGCCA AAATCTGGTA CACAAGGAAA TTATGACGAT
401	GATTGAAAAG GGTTTTATAG TACCGACAAT AAATACGACG CTGCGGGATA CTCTGTAGAT AATGAAAACC CGCTCTCTGG AAAAGCTGGA GCGGTGGTCA
501	AAGTGACGTA TCCAGGACTG ACGAAGGTTT TCGCACTAAA AGTGGATAAT CCGGAAACTA TTAAGAAAAG GTTAGTTTA AGTCTCACTG AACCGTTGAT
601	GGAGCAAGTC GGAACGGAAG AGTTTATCAA AAGGTTCCGT GATGGTGCTT CCGGTGATGT GCTCAGCCTT CCCTTCGCTG AAGGGAGTTC TAGCGTTGAA
701	TATATTAATA ACTGGGAACA GCGGAAAGCG TTAAGCGTAG AACTTGAGAT TAATTTTGAA ACCCGTGGAA AACGTGGCCA AGATGCGATG TATGAGTATA
801	TGGCTCAAGC CTGTGACGGA AATCGTGTC GGCATCTCT TTGTGAAGGA ACCTTACTTC TGTGGTGTGA CATAATTGGA CAAACTACCT ACAGAGATTT
901	AAAGCTCTAA GGTAATATA AAATTTTAA GTGTATAATG TGTTAAACTA CTGATTTCAA TTGTTTGTGT ATTTTAGATT CCAACCTATG GAACTGATGA
1001	ATGGGAGCAG TGGTGGAAAT CAGATCCACT AGGATCTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGTTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT
1101	AAAGCATTIT TTCTACTGCA TTCTAGTTGT GGTTTGTCCA AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCGTAGTTCT AGAATGGTAC CTTCTAGATT
1201	TAATTTTCT TCCGGTCCAC CCTCTGACTT TTCACATCC CATACCTCAT CCGTGTCCC TCTCTCTTA AGTATGTCCC AATCAGCCC CTCCGACCT
1301	CAGTCCAAAC TCTAATCTCC CTGGGGCCTC CAGTCTCATG AGGGTTAGTT GTATCTTCTC TGACTGAACC AAGACCTGGC AGTCTCTGTA TGTGTATGTG
1401	ATGGCAACCT CATAACCTCT CGTGTATGCT GCCTGGTTGG TAGTCCAGTG TCTGAGAGAC TTCTGGGATC CAGGTTAGTT GAGACTGCTG GTACTCCTAG
1501	AGGGTTGCC TCTTCTCAG CTTCTTCCGG TTTTCACTA ATTCAAACCAC AGGGTTCAGC AGCTTCTGCC CATTGGTTGG GTGCAAAATAT CTACATCTGA
1601	CTCTTTCAGC TGCTTGTCCA GGGGGCAGTC ATGATAGGTC CTTTTTTGTG AGCACAAGTG GGATTGCAAA CTGGTACAAC CACTCTGAAA ATCAAGCTGA
1701	AGATTCCTCA GAAAATGGA AATATATCTA CCAGATGACT CAGCAATACC ACTCTTAGGA ATACACCCAA AAAGTTTCCA ACCATGCCTC AGGGGTACAT
1801	GTTCCACTAT GTTCATAGAA GCCTTGTGTTG TGATACCCAG AAGCTAGAAA CAACCCAAACA GAAAGAAGGA CACGAAAAAT GTGGTTTCATT TACACAATGG
1901	AATACTACTC AGATATTAAG AAAAATTATA TCCTGAATTT TGCAGGCAAA TGGATGGAAT TAGAAAACCT CATCTGAGT GAGTAACTC AGATCCAAA
2001	GGATATGCA TGTATGTA CTCTAACAG TGGATATTAG ACACATACAC ACACACAAGT ACAAAAATAG AAAGATATG TTCACAGAAC TCAAAAAGG
2101	TCAACAATGT AAAAGCCCA AGTGAGGACA CCTCAGTACC ACTAGGGAGG TAAAAGAAAAG AAATCACAAG GGAAGAGGGA GGAACCTGGG AGGGAAAGTG
2201	GATGGAGGAA GGGGAACCTG ATGTGTTATT GGGTGAGGGA AAAGGAGTGA AACCCTTAGG TCCAGCAGAA AGAATGGAAA CAGGCAACCT CAGGATGTAG
2301	GAGGTTTGGG GGACCCCTCA GAATATACCA GAAACCTGGG AGGTGAGAGA GTCTCAGAAC TCAGAGGGAG GGACCTAAGA TGAATGGCC TACAGTGTGG
2401	AGAGGAACT TGTAGAGCTC ACCTCTAGCA GAAAGACAGG GCATCAAGTG CCGGATGAGG TTGCCATCCC ACAGTCAATA CTCTGACCCA TTATTATTCT
2501	TCTCTGAAAG AATTGCAAGG ATGGAAAGTG AGAGGAGCCT GAATAAAAAG AGGTCCAGTG ACAAGCCCAA AGTGGGAAAC GATTTTGATT CTTAAAGGAT
2601	GAAAATCAGT GTTGGAGTTC ATGTTTTGTA TCATTTCTGC ACATATCTCT TTAGAAAACA ACAAGGCCAT CACTGGAAGG AGAGGCCCAT TGGACACGCA
2701	ATTTTTATAT GCCCCAGTAC AGGGGAACAT CAGGGCCAAA ATGTGGGAAT GGGTGGGTAG GAAAGTGAGG GGGGGAGGTT ATGAGGACT TTTGAGATAG

2801 CATTGGAAAT TTAATTGAGG AAAATGTGTA ATAAAAATAT ATTTAAAAAA CATCTAAGGG CAAGTTTATG CTTAGATAAT TTAGACTAA TATGGGTATT
2901 GAACATTAGT CAGCACAAAA TAGCTGATAT CAAATGTGTG GGGGAAAAAA CCGAAAAGAT AGTAATCTTT ACTGTACCTA TTTTATGCTG AGTGCCACTT
3001 TTGTATGATT CTGAGTTAAT AGTGCTATGA TGCCAGAGAA ACTCATCTTT GCCTCCCTCT TGCCTGTGTT GCTGTAAAGTA TGCTACAGG GCTTGTGTGC
3101 CTACCTTTTT GCATCCTATA TGCTACTCAC CTATGTGTGG TCCTTGAAATA CCAGAACATG CTTTGGTTCC TGCAGGTATA TACCTACCCCT GAAAGCTTCA
3201 TCTAGAGTAA ACAAAAGTAGT CTGTATAGTC TGCCATTCCT CAGATTCTCC TCAACTTCCC ACCCTCCAGT GACCTTTTCT CTTTTCTACA GTCAAACTAT
3301 GGACCTCACA ACCTGACACT TCTTCAGATG CAAAATATTC TCACAGAGAC AAGTAAAAACA TACAAAAACA ATACTTTAAT TTGCCTATTA ACAAAATGGCA
3401 AGAAAAGATT CAGGCTTGA AATCCTGTAG ACAAGCTAAG GACAGGAGCA ACTGAAGGGA TCTCCATGAA GACCTTTCAG ATTTCTACCA AAAAGTAATTT
3501 TTAACATAT TTAAGTCTTT AAAGAAAAGAA AGTAAAGCCA CTCTTTTATT GAACAGCAAT AGATTGGAAT CTTAAACAAC TGCAACAGAA GCCATTTTAA
3601 AGATCAACAA AGACCGGTTA AATCCCGCGG GCCACCATGT CAGGAGAGGA TGACTTTTAC CTGTTTCAGA ATATCTTCTC GGTGGGGCCC TGGGATGGG
3701 CTCAGTACCA CTTGTCTCTT GTCTGGGCTT TCCGCCCTCA GGCAGCCTTC ATGGGATTG TCTTCTTTGT GGGGACCCCA CTCATGCCA TAGTGCTGGT
3801 GGCCACACTG CATTACAAAA AGTTGCGACA GCCCTCAAC TATATTCTGG TCAATGTATC CCTCGGGGC TTCTCTTCT GCATCTTCTC TGTCTTACA
3901 GCTTTCATCG CCAGCTGTCA CGGATACTTC CTCFTTGGTC GCCATGTTTG TGCTCTGGAG GCCTTCTTGG GCTCTGTAGC AGGTCTAGT ACAGGATGGT
4001 CATTGGCTTT CTGGCTTTT GAACGCTACG TTGTCATCTG TAAACCCCTC GGCAGCATCC GCTTCAACTC CAAGCATGCA CTGATGGTG TCCTGGCTAC
4101 TTGGATTATT GGTATCGGGG TGTCCATCCC ACCCTTTTTT GGCTGGAGCA GGTTCATCCC TGAGGGCCTG CAGTGCTCT GTGGCCAGA CTGGTACACT
4201 GTGGCACCA AGTATCGAAG CGAGTACTAC ACCTGGTTCC TCTTCACTT CTGTTTCATC ATTCCTCTT CCTCATCTG CTCTCTCTAC TCCAGTTGC
4301 TGAGGACTCT CAGAGCTGTG GCAGCTCAGC AGCAAGAGTC TGCTACGACA CAAAAGGCTG AACGGGAGT GAGTCATATG GTGGTGTGA TGGTGGGATC
4401 CTTCTGTCTC TGCTACGTGC CCTATGCTGC CCTGGCCATG TACATGGTCA ACAATCGGAA CCACGGGCTG GACTTACGGC TTGTACCAT CCCCCTCTC
4501 TTTTCCAAGA GCTCCTGTGT CTACAACCC ATCATCTACT GCTTCACTGAA TAAGCAGTTC CGGGCTTGC TTTCTGGAGT GGTGTGCAGG AAGCCCATGG
4601 CAGACGAATC TGACGTGTCT GGCTCTCAGA AAACAGAAGT TTCTACTGTC TCTTCTAGCA AAGTTGGCCC TCACGTGAA TCTAGATATC GATGAATTCA
4701 TAACCTCGTA TAATGTATGC TATACCGAAGT TATGACTG TGACTGAGT GACTGATGCG AAGCAAGCGT TGGTTTAT GCTGCTTT

ACN-Selektionskassette (einzeln aufgeführt)

8301 AACTCTGAGT TGGGAGCGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT TGGTCTGAGT
8401 CGAAGTTATA AGCTTTCCGG AGCTCGAGAT CTATAGTCGA CCAGTCTGGA ACACATGCAA TCTGGAATTG TCAGTGGAAA AAGTTACTGA AGATCTTTTC
8501 ACTTGCACTA TGCTCTTTTA TTGATTGGC ATCATTATCA AACACTGTTG GAGCCTTGTG AACTCTTGT CAGAGTCTTC TGCCTCTCAA GGAATCACAC
8601 TCCCAGATGG AATTTTAACT CCATGTACAG GTTAATTGT TCAGTCAGTC TCCAACTCGT TAGTCTGTTC CTGTACATT GCCAAAGGAA AACACTCAAC
8701 TATAGACCAA CCATGCAA GAAAGATTTC ATGGTGTGCC AAACATCCAA AAACACTTCA TTGTGATTCC CTGGCTTTC CTGTACCATT GACCCCTTTT
8801 CTCCAGAAGA CTCAAAAGAAA AGGAAAACCAA GACAGAGCGT TACAGTTAAT CTGAACATGA AACTGTTGTG TACATTTTGG AAAATGAAAC TTTTCTGTAC
8901 ATTTTACTT CTTCATAAGT TGCCTTTATT CTAACACATT AAACACTACA GTTTATGTTA CATTAAAGTAT TTGATACAGT ACCATGGCCA TAATCATAGA
9001 TTAAGCTATG ATAAATAGCT AGAAAAACAG TAATAGGAAA AAAGATTAGA AGGATGATGA AATGATTCTT CATACTGATC AATGCCACTG ACACCAAATC
9101 AGACAGAGAG GAGGTTCCCT CAAATAACA GCTGGTCACC ATTATTCTTG CTTACTCACT AGAATTTTAT AAGACCTTAC TGATGAAAAG AGTACAATTT
9201 TAGGACACAA GACATATATA CACGAGACAT GGAAGTACAT AGAAAATTGT ACAGAAAAGG AAAAGAAAAG GAAGAGCATT GTAGTGTAA GCTGAAAACG
9301 TTAATAATCAT AATGTGCTTT ATTTTAAAAA TCTTTATGAA ATTTATCAGT AAGTACAATT ATTCACAAAT ACCACTTTTT TCTTATTCTG AAACCTGTCA
9401 TACCTACAAA GGAGCTTACA TGTTAATTA ACATTAATAA AATATTCTAG AGTAAAATCA TTATATTCTT TCTATATCTA ATTAGTTTTT ATTTGTATAC
9501 TCAGGTTATG TGTATAAGCT ATAAAATTAT GGTAAATTTCT CTCCCTCTCA GTTTCTATTC TTTCTTTGTC CTTTTAGTTT TATAGCTGTG AATTTTTTTT
9601 TCAGAAAAGA GTTGTAGTTT AGCTAACTGG TCTTACTCT ACAGAAATAA GTGGTGTCTAT ATTTTACCTC CCAAGAAAAC TACTAGTATG GCATTTGTTA
9701 TCTTGACAAA CTCACGATGA TGATTGCGTA TTTAAAACGT AAAATTAAGT GTTGCTCCAG TTGCTTAATT TCTTCTGTT TATATCTGTC ACTCCTACTC
9801 AACTACTAGA CTTATTACAT GCAAAAATAG ATCAGAGGGG AAATTACAAG AAATGAAAAC CATCATTGTC TTATAAGAAA ATTACAAGGC ATTTATTCTG
9901 CACCCATTCT GTAGATAAGT TAACTCTTAC AGGGAAAAGT GACAGAACTC TAGGAAAACA CTTGAGATTC CCCCACAAAC TAATTTTGTAT GTGTTTTTAA
10001 ATCCTTTATT TAAGGAAAAG AGAAAAAAT CTATGAAAGAA CTCAAATATAG AGGACACTCT GCAGCAGATC TACTATAGAT GCAACAGATA CAACCTTAGG
10101 GACCTGGAGA TATGCTGAGT GCGGCAGAA GATCCTCTCT TTCCATTGCA ACTGTTGAA GCTGGGCTGG AGTTTTAGGG AACACATTTA TTGCACTGGT
10201 AAACCTGATG GACTGGGCA AGAAATAA GCTTTCTATG ACTGGCTTCC TTCTCATCGG CTTAGCAACT TCCAGGATTT TTATTGTGTG GCTATTAAT
10301 TTAGATGCAT GTGAAAGCT ATTCTATCCA AGTAAATAT TTTCTAGTAT TCTGTAGTAA ATCATCTCTT ATATATGGAT GACTGTGAAT CACCTGACTG
10401 TCTGTTTGC CACCAGCCTA AGCATCTTCT ATTTCTGTAA GATAGCCAAT TTTTCCGACT GCGGCCGCAC GTTAAAGACGT CAGGTGGCAC TTTTCCGGGA
10501 AATGTGCGCG GAACCCCTAT TTGTTTATTT TTCTAAATAC ATTCAAATAT GTATCCGCTC ACGAGACAA AACCCTGATA AATGCTTCAA TAATATTGAA
10601 AAAGGAAGAG TATGATATT CAACATTTC GTGTGCGCCT TATTCCTTT TTTGCGCAT TTTGCTTCC TGTTTTGTCT CACCAGAAA CGCTGGTAA
10701 AGTAAAAGAT GCTGAAGATC AGTTGGGTG ACGAGTGGGT TACATCGAAG TGGATCTCAA CAGCGGTAAG ATCCTTGAGA GTTTTCGCC CGAAGAAGCT
10801 TTTCAATGA TGAGCACTTT TAAAGTTCTG CTATGTGGCG CGGTATTATC CCGTATTGAC GCCGGGCAAG AGCAACTCGG TCGCCGCATA CACTATTCTC
10901 AGAATGACTT GGTGAGTAC TCACCACTCA CAGAAAAGCA TCTTACGGAT GGCATGACAG TAAGAGAATT ATGCACTGCT GCCATAACA TGAGTGATAA
11001 CACTGCGGCC AACTTACTTC TGACAACGAT CGGAGGACCG AAGGAGCTAA CCGTTTTTTT GCACAACATG GGGATCATG TAACCTGCTT TGATCGTTGG
11101 GAACCGGAGC TGAATGAAGC CATAACAAAC GACGAGCGTG ACACCAAGAT GCCTGTAGCA ATGGCAACAA CGTTGCGCAA ACTATTAAT GCGCAACTAC
11201 TTAATCTAGC TTCCCGGCAA CAATTAATAG ACTGGATGGA GCGGATAAAA GTTGACAGGAC CACTTCTGCG CTCGGCCCTT CCGGCTGGCT GGTATTATGC
11301 TGATAAATCT GGAGCCGGTG AGCCTGGGTC TCGCGGATC ATTGCAGCAC TGGGGCCAGA TGGTAAAGCC TCCGATATCG TAGTTATCTA CACGACGGGG
11401 AGTCAGGCAA CTATGGATGA ACGAAATAGA CAGATCGGCT AGATAGGTGC CTCACTGATT AAGCATTGGT AACTGTGAGA CCAAGTTTAC TCATATATAC
11501 TTTAGATTGA TTTAAAACCT CATTTTAAT TTAAGAGGAT CTAGGTGAAG ATCCTTTTTG ATAATCTCAT GACCAAAATC CCTTAAAGCTG AGTTTTCTGT
11601 CCACTGAGCG TCAGACCCCG TAGAAAAGAT CAAAGGATCT TCTTGAGATC CTTTTTTTCT GCGGTAATC TGCTGCTTGC AAACAAAAAA ACCACCGCTA
11701 CCAGCGGTGG TTTGTTTGGC GGATCAAGAG CTACCAACTC TTTTCCGAA GGTAACTGCG TTCAGCAGAG CGCAGATACC AAATACTGTC CTTCTAGTGT
11801 AGCCGTAGTT AGGCCACCAC TTCAAGAACT CTGTAGCACC GCCTACATAC CTCGCTCTGC TAATCTGTT ACCAGTGGCT GCTGCCAGTG GCGATAAGTC
11901 GTGTCTTACC GGGTTGGACT CAAGACGATA GTTACCGGAT AAGGCGACGC GGTGCGGCTG AACGGGGGGT TCGTGACAC AGCCCAAGCTT GGAGCGAAGC
12001 ACCTACACCG AACTGAGATA CCTACAGCGT GAGCATTGAG AAAGCGCCAC GCTTCCCGAA GGGAGAAAAG CCGACAGGTA TCCGGTAAAG GGCAGGGTGC
12101 GAACAGGAGA GCGCACGAGG GAGCTTCCAG GGGAAAACGC CTGGTATCTT TATAGTCTG TCGGTTTTCG CCACCTCTGA CTTGAGCGTC GATTTTTGTG
12201 ATGCTCGTCA GGGGGGCGGA GCCTATGAAA AAACGCCAGC AACCGGCGCT TTTTACGGTT CTGGCCTTT TGC

Vektor pACN



<i>loxP</i>	682-714 bp
neo	742-1600 bp
RNA-Pol-II-Promotor	1617-2322 bp
Cre	2338-3650 bp
tACE-Promotor	3651-4350 bp
<i>loxP</i>	4357-4389 bp
Amp R	5669-6526 bp

1	CACCTAAATT	GTAAGCGTTA	ATATTTTGGT	AAAATTCGGG	TTAAATTTTT	GTTAAATCAG	CTCATTTTTT	AAACCAATAGG	CCGAAATCGG	CAAAATCCCT	TATAAATCAA	AAGAATAGAC
121	CGAGATAGGG	TTGAGTGTG	TTCCAGTTTG	GAACAAGAGT	CCACTATTTAA	AGAACGTGGA	CTCCAACGTC	AAAGGGCGAA	AAACCGTCTA	TCAGGGCGAT	GGCCCACTAC	GTGAACCATC
241	ACCCTAATCA	AGTTTTTTGG	GGTCGAGGTG	CCGTAAGAAG	CTAAATCGGA	ACCCTAAAGG	GAGCCCCGGA	TTTAGAGCTT	GACGGGGAAA	GCCGGCGAAG	GTGGCGAGAA	AGGAAGGGAA
361	GAAAGCGAAA	GGAGCGGGCG	CTAGGGCGCT	GGCAAGTGTA	GCGGTCAACG	TGCGCGTAAC	CACCACACCC	GCCGCGCTTA	ATGCGCGCTC	ACAGGGCGCG	TCCCATTCGC	CATTGAGGCT
481	GGCAACTGT	TGGGAAGGGC	GATCGGTGCG	GGCCTCTTCG	CTATTACGCG	AGCTGGCGAA	AGGGGGATGT	GCTGCAAGCG	GATTAAGTTG	GGTAAACGCCA	GGGTTTTTCCC	AGTCACGAGC
601	TTGTAATAACG	ACGGCCAGTG	AATTGTAAATA	CGACTCACTA	TAGGGCGAAT	TGGAGCTCGA	GATCTAGATA	TCGATGAATT	CATAACTTCG	TATAATGTAT	GCTATACGAA	GTTAATGGATC
721	TGTCGATCGA	CGGATCGATC	CGAACAAACG	ACCCAAACCC	CGTGGCTTTT	ATTCTGTCTT	TTTATTGGCC	ATCCCTCAG	AAGAAGCTCGT	CAAGAAGGGC	ATAGAAGGGC	ATGCGCTGGC
841	AATCGGGAGC	GGCGATACCG	TAAAGCAGGA	GGAAAGCGGT	AGCCCATTCG	CCGCCAAGCT	CTTCAGCAAT	ATCACGGGTA	GCACACGCTA	TGTCTGATA	GGGTCGCCG	ACACCCAGCC
961	GGCCACAGTC	GATGAATCCA	GAAGAAGGGC	CATTTTCCAC	CATGATATTC	GGCAAGCAGG	CATCGCCATG	GGTCACGAGC	AGATCTCCGC	CGTCGGGCAT	CGCCGCTTG	AGCATGGGCA
1081	ACAGTTCGGC	TGGCGCGAGC	CCCTGATGCT	CTTCGTCGAG	ATCATCTCGA	TGCACAAGAC	GGGCTTCCAT	CCGAGTACGT	GCTCGCTGAT	GCTCGGTTT	TCGATGGTGG	TCGATGGGCG
1201	AGGTAGCCGG	ATCAAGCGTA	TGCAGCGCCG	GCATTGCACT	AGCCATGATG	GATACTTCTT	CGGCAGGAGC	AAGGTGAGAT	GACAGGAGAT	CGTGGCCCGG	CATTTCGGCC	AATAGCAGCC
1321	AGTCCCTTCC	CGCTTCAGTG	ACAACGTCGA	GCACAGCTGC	GCAAGGAAGC	CCGCTCGTGG	CCAGCCAGCA	TAGCCCGGCT	GCCTCGTCTC	GCAGTTCATT	CAGGGCACCG	GACAGCTCGG
1441	TCTTGACAAA	AAGAAGCGGG	GGCCCTGCGG	CTGACAGCCG	GAACACGGGG	GCATCAGAGC	AGCCGATTTG	CTGTTGTGGC	CAGTCAATAGC	CGAATAGCCT	CACCCACAA	GGCGCGGAG
1561	AACCTGCGTG	CAATCCATCT	TGTTCAATGG	CCGATCCCAT	ATTGGCTGCA	CGGATCCTGA	AGCCGACAGG	TTACGGCAGT	TTGTCTCTCC	CCCTTCGGGG	AGCCACCTTC	TTTCCAACCC
1681	GTCCCGGTGC	GGTCTCGGGC	GCTTCTGAGG	AGAGAACTGG	CTGAGTGAGC	CCCTTTATAG	ATTGCGCCTT	GTGTCCCGGC	CCTTCCCTTC	CCGCGCTCCG	TTGCGGTACG	GGCGCGCCGG
1801	CACCGGCTTA	CACGAGCGCC	GGCGGGCGGA	GTTGTTGAGC	CTAGGGCTCC	GGCTCCCTGG	TTGGGTGTTT	TTTCTGACGC	GACAGGAGGA	GGAGAATGTT	CCTGTCTCTG	TGCTCCCTCC
1921	TTCCGGTTTC	CCGTGCACTC	AAACCGAGGA	CTTACAGAAC	GGAGGATAAA	TTTAGGCCAT	TTTTACTCAG	CTTCGGAGTT	CAGGCTCAAT	TTCAAGTAAA	GCTCTCAATT	AGCATCCCTC
2041	CACACACATC	GGGAAAATGG	TTTGCTCTAC	GCATCGGTA	TGAAGGCGGG	GGCCTTCGGG	TCTCCGGAG	CGGGTCCGG	GGGTGGGGGG	AAGGAGGGAG	GGACGGGAGC	GGCCTCGTTC
2161	ATGAATATTC	AGTTACACGC	TGAATATGCA	TAAAGCAGGC	AAGATGGCGC	GTCCAAATCA	TTGGAAGTAG	CCGTTATTAG	TGGAGAGGCC	CCAGACGCTT	GGGACACCGC	CTGTGCTCTA
2281	GTAGCTTTAC	GGAGCCCTGG	CGCTCGATGT	TCAGCCCAAG	CTTTCGGGAG	CTCGACCGAA	CAAAACGACC	AACACCCGTC	CGTTTTATTCT	TGCTTTTTTA	TTGCGGCTCA	GCTTTAGACT
2401	GACAATGAGC	GCTGGCGACT	GAATATTAGT	GCTTACAGAC	AGCACTACAT	ATTTCCGCTC	GATGTTGAAA	TCCCTTCTCA	TATGTACCA	TAAATATGCA	ATAATTATAG	CAATCATTTA
2521	CGCGTTAATG	GCTAATCGCC	ATCTTCCAGC	AGGCGCACCA	TTGCCCTCTG	TTCACTATCC	AGGTTACGGA	TATAGTTTCA	GACAATATTT	ACATTTGGTC	AGCCACCAAG	TTGCATGATC
2641	TCCGTAATTC	AAACTCCAGC	CGCGGGCATA	TCTCGCGCGG	CTCCGACAGC	GGCACTGTGT	CCAGACCCAG	CCAGGTATCT	CTGACCCAGG	TCATCTATA	ATACACAAAC	AATTAGAAATC
2761	AGTAGTTTAA	CACATATATC	ACTTAAATA	TTTATATTTA	CCTTAGCGCC	GTAAATCAAT	CGATGAGTTG	CTTCAAAAAT	CCCTTCCAGG	CGCGGAGTTG	ATAGCTGGCT	GGTGGCAGAT
2881	GGCGGGCGAA	CACCATTTTT	TCTGACCCGG	CAAAACAGGT	AGTTATTCCG	ATCATCGAAT	CACCCAGAGA	CGGAAATCCA	TCGCTCGACC	AGTTTAGTTA	CCCCAGAGCT	AAGTACCTTC
3001	TCTACACCTG	CGGTGCTAAC	CAGCGTTTTT	GTTCTGCCAA	TATGGATTAA	CATTCTCCCA	CCGTCACTAG	GTGAGATATC	TTTAAACCTG	ATCTGGGCAA	TTTCGGCTAT	ACGTAACAGG
3121	GTGTTATAAG	CAATCCCCAG	AAATGCCAGA	TTACGTATAT	CCTGGCAGCG	ATCGCTATTT	TCCATGAGTG	AACGAACCTG	GTGCAATATC	GTCGGTTCGA	ACGCTAGAGC	CTGTTTTGCA
3241	CGTTCACCGG	CATCAAGCTT	TTCTTTTCGG	ATCCGCGCGA	TAAACAGTGA	AACAGCAATTG	CTGTCACTTG	GTGTTGGCAG	CCCGGACCGA	CGATGAAGCA	TGTTTAGCTG	GCCCAATGTC
3361	TGCTGGATAG	TTTTTACTGC	CAGACCGCGC	GCCTGAAGAT	ATAGAAGATA	ATCCGGAACA	TCTTCAGGTT	CTCGGGGAAA	CCATTTCCCG	TTATTCAACT	TGCACCATGC	CGCCACAGC
3481	CGCRAACGG	ACAGAAGCAT	TTTCCAGGTA	TGCTCAGAAA	ACGCTCGGGC	ATCCCTGAAC	ATGTCCATCA	GTTCTTGGC	AACCTCATCA	CTGCTTGCAT	GCACCGGTA	TGCAGGCAAA
3601	TTTTGGTATA	CGGTCAAGTA	ATTGGACACC	TTCTCTTCTT	TCTTGGGCAAT	GGCCGACGCA	AAGCAGGCC	CTGAAGCTCC	CATCACCGCG	CAATAAGAGC	CAAGCTCGCA	GTGTGCACTC
3721	ATAGAGCACT	CTGTGGCAGC	AGCTGAACCC	AAGGGCCCTC	AGCTTGGGCG	ACACTGTCTC	TAGGAGGCTC	AGGAAAGAGC	ATACCCATTT	CTGTTAGGG	CGCTAGGATG	GAGCCACAGG
3841	TGGGCTTGGC	ACTGAAGCAA	AGGACACTGG	GGCTCAGCTG	CGAGCAAGGT	GACCAGGATG	TAGGAGCTTT	GACCCAGAAG	CCAGAGGCCA	GAGGCGAGGA	CTTCTCTTGG	TCCCAAGTCA
3961	CCCTCACTCA	GAGCTTTACC	AATGCCCTCT	GGATAGTTGT	CGGGTAACGG	TGAGCGCCAC	TGATTTCTGT	GCCAGCCTAG	GACTTCGCCA	TTCCGCTGAT	TCTGCTTTTC	CAGCCACTGG
4081	TGACCCGGTT	GGAAAGTACT	CAGCAGTGCC	TTGGCATCCA	GGGCATCTGA	GCCTACCAGG	TCCTTCAGTA	CCTCTGCCA	GGGCTGGAG	CAGCCAGCCT	GCAACACCTG	CCTGCCAAGC
4201	AGAGTGACCA	CTGTGGGCAC	AGGGGACACA	GGGTGGGGCC	CACAACAGCA	CCATTGTCCA	CTTGCTCCCT	ACTAGTAAAA	GAACTTAGG	GTTGCGGGGG	GTGGGGGAGG	TCTCTGTGAG
4321	GCTGTTAAGG	GATATTTGCC	TGGCCCATGG	AGATCCATAA	CTTCGTATAA	TGTATGCTAT	ACGAAGTTAT	AAGCTTTCGC	GAGCTCGAGA	TCTAGATATC	GATACCGTCG	ACCTCGAGGG
4441	GGGGCCCGGT	ACCCAGCTTT	TGTTCCCTTT	AGTGAGGGTT	AATTTCCGAG	TTGGCATAAT	CATGGTCATA	GCTGTTTCTC	GTGTGAAAT	GTTATCCGCT	CACAATTCCA	CACAACATAC
4561	GAGCCGGAAG	CATAAAGTGT	AAAGCCTGGG	GTGCGTAATG	AGTGAAGTAA	CTCACATTTA	TTGCGTTGGC	CTCACTGCC	GCTTTCCAGT	CGGGAAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT
4681	GAATCGGCCA	ACCGCGGGGG	AGAGGGCGGT	TGCGTATTGG	GGCCTCTTCC	TCTCTCCG	TCACCTGACT	GCTGCGCTCG	GTGCTTGGC	GCTGCGGAGC	GGTATCAGCT	CACCTAAAGG
4801	CGGTAATACG	GTTATCCACA	GAATCAGGGG	ATAACGCAGG	AAAGAACATG	TGAGCAAAA	GCCAGCAAAA	GGCCAGGAAC	CGTAAAAAGG	CCGCGTTGCT	GGCGTTTTTC	CATAGGCTCC
4921	GCCCCCTGA	CGAGCATCAC	AAAATTCGAC	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	ATACCAGGGC	TTTCCCGCTG	GAAGCTCCCT	CGTGGCTCT	CCTGTTCCGA
5041	CCCTGCCGCT	TACCGGATAC	CTGTCCGCTC	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG	GGCCTTTCTC	ATAGCTCAGC	CTGTAGGATG	CTCAGTCCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAG	CTGGGCTGTG
5161	TGCAGGAACC	CCCCGTTTCA	CCGACCCGCT	GGCCTTATC	CGGTAACAT	CGCTTGAAT	CCAACCCGGT	AAGACACGAC	TTATCGCCAC	TGGCAGCAGC	CAGTGTGAAC	AGGATTAGCA
5281	GAGCGAGGTA	TGTAGCGGTT	GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	GTGGCTTAAC	TACCGCTACA	CTAGAAGGAC	AGTATTGTTG	ATCTGCGCTC	TGCTGAAGCC	AGTTACCTTC	GGAAAAAGAG
5401	TTGGTAGCTC	TGATCCGGC	AAACAAACCA	CGCTGTGTAG	CGGTGGTTTT	TTTGTGCA	AGCAGCAGAT	TACGCGCAGA	AAAAAAGGAT	CTCAAGAGA	TCCTTTGATC	TTTTCTACGG
5521	GTCTGACGC	TCAGTGAAC	GAAAACTCAC	GTTAAGGGAT	TTTGTGCATG	AGATTATCAA	AAAGGATCTT	CACCTAGATC	CTTTTAAAT	AAAAATGAAG	TTTTAAATCA	ATCTAAAGTA
5641	TATATGAGTA	AACCTGGTCT	GACAGTTACC	AATGCTTAAT	CAGTGAGGCA	CCATCTCTAG	CGATCTGTCT	ATTTCTGTTA	TCCATAGTTG	CCTGACTCCG	CGCTGCTAG	ATAACTAGCA
5761	TACGGGAGGG	CTTACCATCT	GGCCCCAGTG	CTGCAATGAT	ACCCGAGAC	CCACCTCAG	CGGCTCCAGA	TTTATCAGCA	ATAAACCCAG	CAGCCGGAAG	GGCCGAGGCG	AGAAGTGGTC
5881	CTGCAACTTT	ATCCGCTCC	ATCCAGTCTA	TAAATTTGTT	CGGGGAAGCT	AGAGTAAGTA	GTTCGCGAGT	TAAATGTTTG	CGCAACGTTG	TTGCCATTGC	TACAGGCATC	GTGGTGTAC
6001	GCTCGTCTT	TGGTATGGCT	TCATTACAGT	CCGGTTCCCA	ACGATCAAGG	CGAGTTACAT	GATCCCCCAT	GTTGTGCAAA	AAAGCGGTTA	GCTCTTCGG	TCTCCGATC	GTTGTGCAAA
6121	GTAAGTTGGC	CGCAGTGTTA	TCACACTAGG	TTATGGCAGC	ACTGCATAAT	TCTCTACTTG	TCATGCCATC	CGTAAGATGC	TTTTCTGTGA	CTGGTGAAGTA	CTCAACCAAG	TCATTTCTAG
6241	AATAGTGTAT	CGCGCAGCC	AGTTGCTCTT	CGCCGGCGTC	AATACGGGAT	AATACCGCGC	CACATAGCAG	AACCTTAAAA	GTGCTCATCA	TTGGAAAACG	TTCTCCGGGG	CGAAAACCTC
6361	CAAGGATCTT	ACCGCTGTTG	AGATCCAGTT	CGATGAAC	CACCTGGTCA	CCCAACTGAT	CTTCAGCATC	TTTTACTTTC	ACCAGCGTTT	CTGGGTGAGC	AAAAACAGGA	AGGCAAAATG
6481	CCGCAAAAAA	GGGAATAAGG	GCGACACGGA	AATGTTGAAT	ACTCATATCT	TTCCCTTTTC	AATATTATTG	AAGCATTTAT	CAGGGTTATT	GTCTCATGAG	CGGATACATA	TTTGAATGTA
6601	TTTACAAAAA	TAAACAATA	GGGGTCCGC	GCACATTTCC	CCGAAAAGTG	C						

8.5 Funktionalität der *In-situ*-Sonden und Antikörper für Opsine

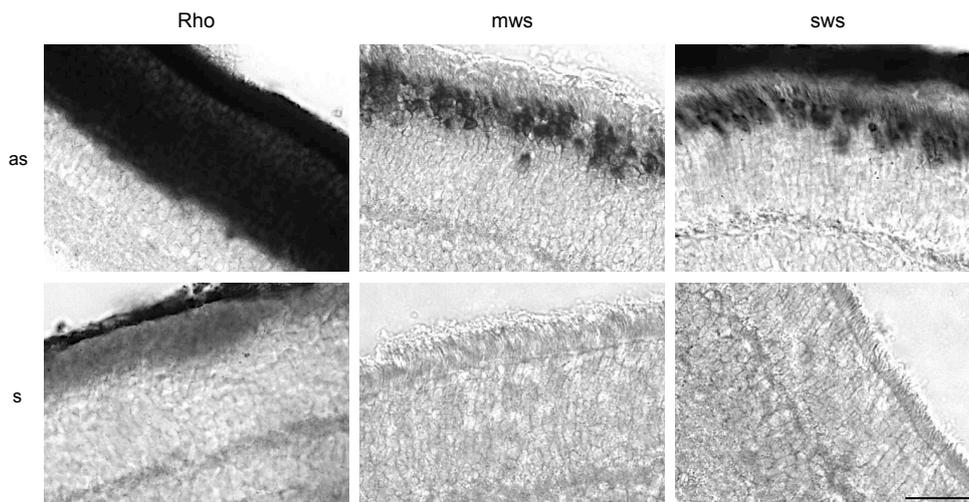


Abb. 8.1. RNA-Expressionsanalyse von Opsinen im Auge mittels *In-situ*-Hybridisierung. Zur Überprüfung der Funktionalität der Opsin-*in-situ*-Sonden wurden Gewebeschnitte des Auges von C57BL/6-Tieren untersucht. Die Hybridisierung von Augenschnitten (14 μ m) mit antisense-(as)-Sonden für humanes Rhodopsin (Rho), Opsin medium wavelength sensitive (mws) und short wavelength sensitive (sws) führte zu deutlichen Markierungen in der äußeren Schicht der Retina. Die sense-(s)-behandelten Schnitte blieben frei von Signalen. Maßstab: 20 μ m.

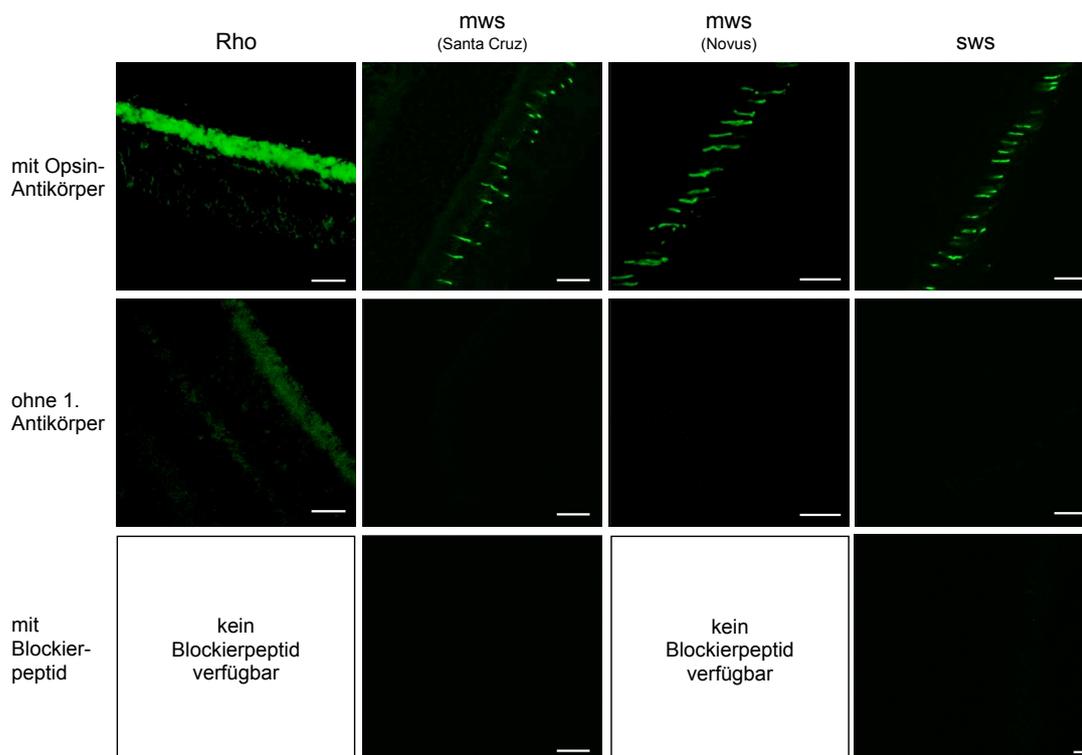


Abb. 8.2. Immunhistochemischer Nachweis von Opsinen. Fluoreszenzaufnahmen von Kryopräparaten (14 μ m) des Auges nach einer Antikörperfärbung gegen humanes Rhodopsin (Rho), Opsin mws (medium wavelength sensitive) und sws (short wavelength sensitive). Die Gewebeschnitte zeigten Markierungen von zellulären Strukturen im äußeren Segment der Retina. Diese konnten nicht bei Gewebeschnitten, die ohne Erstantikörper oder mit einem Antikörper-Blockierpeptid-Gemisch behandelt wurden, beobachtet werden. Maßstab: 20 μ m.

8.6 Gewebeanalysen der Mausmodelle

Für die PCR-Analysen des C57BL/6-Tieres und der genetisch veränderten Mäuse wurden 29 Organe entnommen. Hierbei wurde zumeist das gesamte Organ (ggf. auch paarig) entnommen und aufgearbeitet. Abweichend hiervon wurde für Gewebe der Leber, Niere, Lunge und Oberschenkelmuskel verfahren. Für die RNA-Gewinnung dieser Gewebe wurde ausschließlich der rechte Leberlappen, die linke Niere, der linke Lungenflügel und der rechte Oberschenkelmuskel eingesetzt.

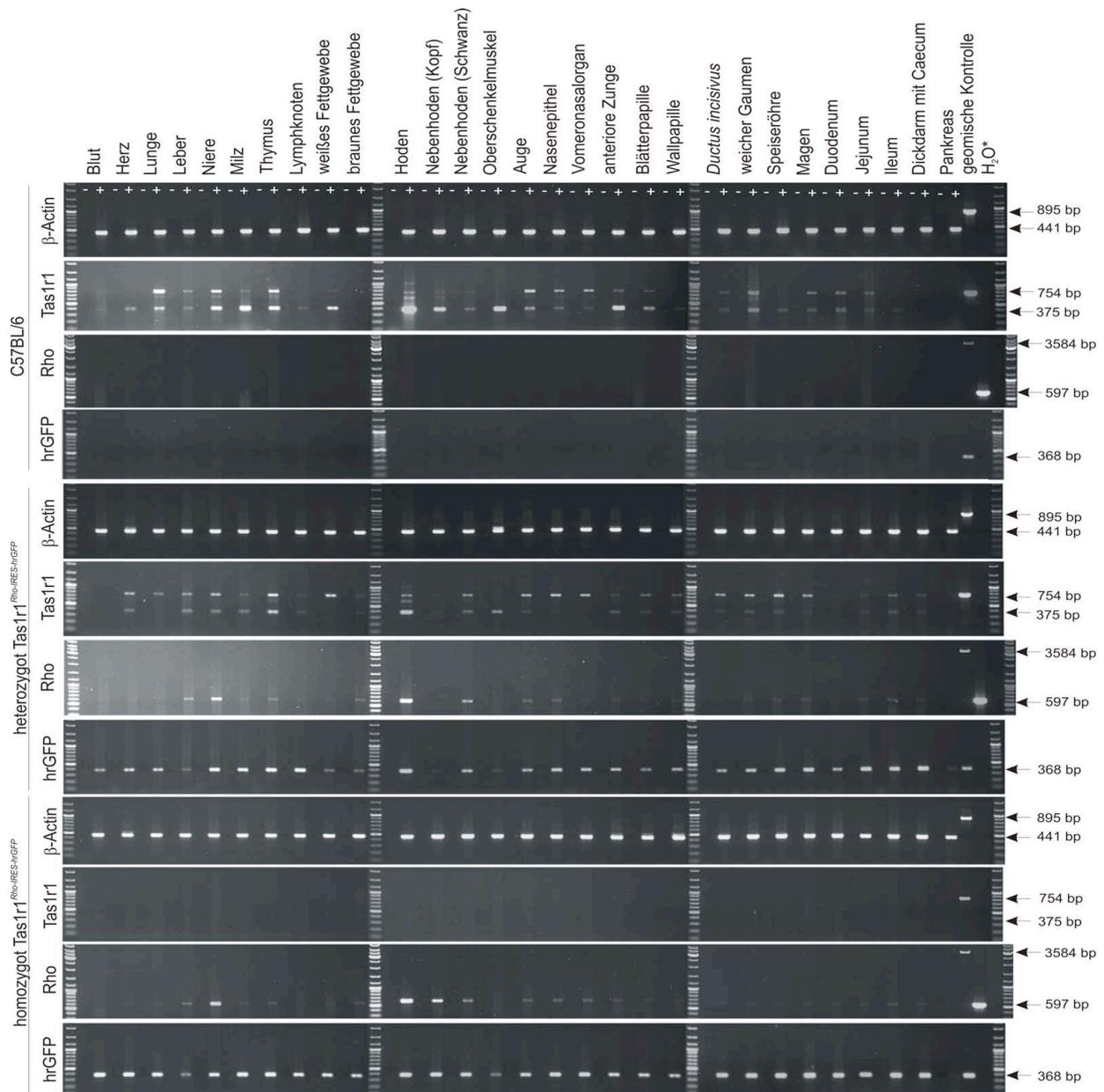


Abb. 8.3. RT-PCR basierter Nachweis des *Tas1r1*-Knockouts und des Rhodopsin-hrGFP-Knockins in der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Linie im Vergleich zu C57BL/6. Nach Isolation der RNA aus 29 Geweben der C57BL/6 und heterozygoten bzw. homozygoten *Tas1r1*-Maus wurde diese in cDNA umgeschrieben und als „Template“ für die Amplifikation von β -Aktin, *Tas1r1*, Rho (Rhodopsin) und hrGFP (humanized renilla green fluorescent protein) herangezogen. Als Positivkontrolle diente genomische DNA der C57BL/6-Maus. Abweichend davon wurde für die Rho-PCR cDNA des menschlichen Auges und humane genomische DNA eingesetzt, während für die hrGFP-PCR genomische DNA der *Tas1r1^{Rho-IRES-hrGFP}*-Maus verwendet wurde. Die Visualisierung der PCR-Produkte erfolgte mittels Ethidiumbromid nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarosegel. Die Amplifikation von cDNA bzw. genomischer DNA führte zu PCR-Fragmenten von 441 bp (cDNA) und 895 bp (genomisch) für β -Aktin, 375 bp (cDNA) und 754 bp (genomisch) für *Tas1r1*, 597 bp (cDNA) und 3584 bp (genomisch) für Rho und 368 bp für hrGFP. *, mit Ausnahme für die Rho-RT-PCR zeigt die Spur die Negativkontrolle (Wasser als Matrize), im Fall der Rho-RT-PCR ist das PCR-Produkt von cDNA des humanen Auges abgebildet, der die Wasserkontrolle folgt.

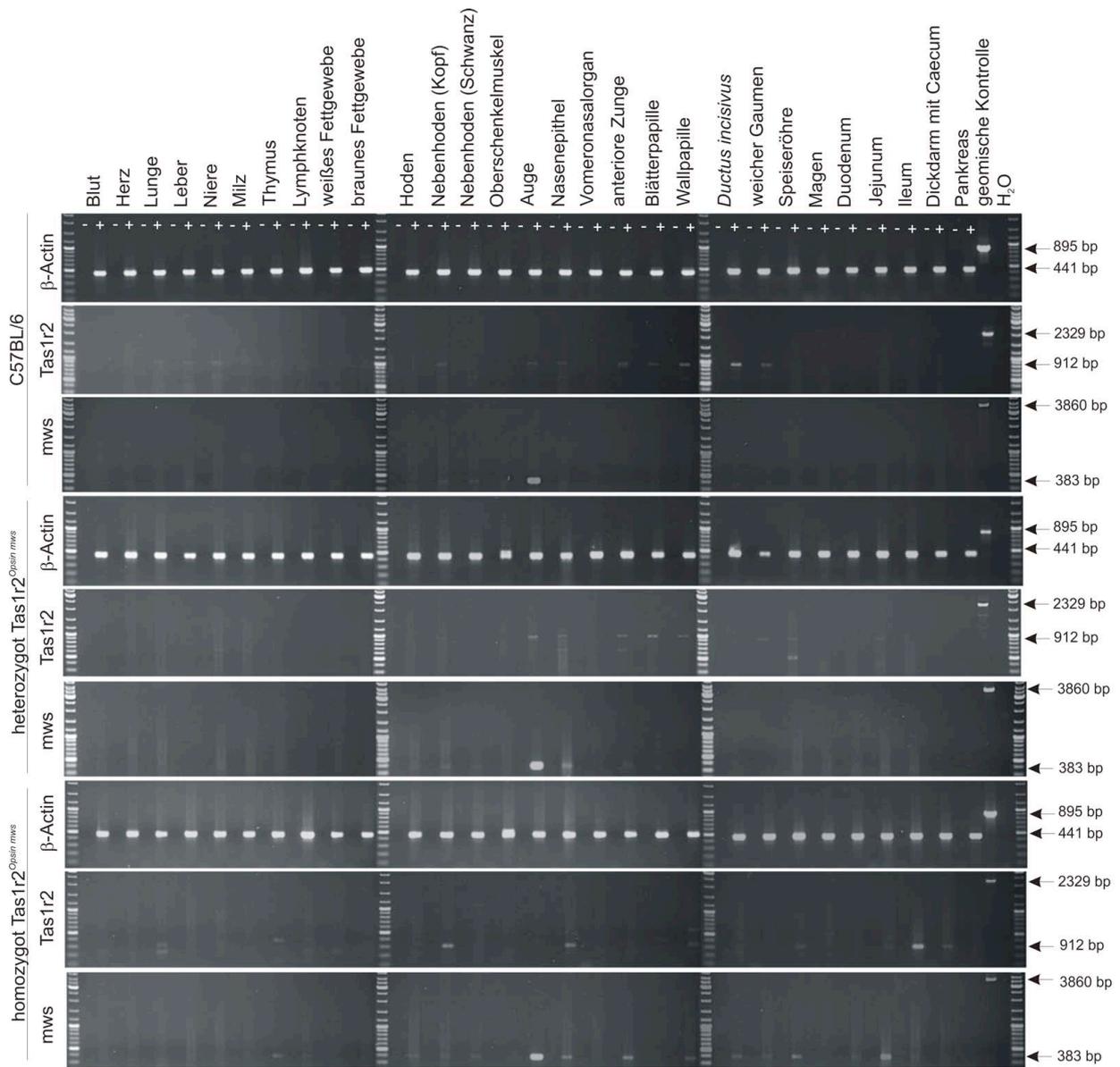


Abb. 8.4. RT-PCR basierter Nachweis des *Tas1r2*-Knockouts und des *Opsin mws*-Knockins in *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus im Vergleich zur C57BL/6-Linie. Nach Isolation der RNA aus Geweben der C57BL/6 und heterozygoten bzw. homozygoten *Tas1r2^{Opsin mws}*-Maus wurde diese in cDNA umgeschrieben und als Template für die Amplifikation von β -Aktin, *Tas1r2* und *Opsin mws* (medium wavelength sensitive) herangezogen. Die genspezifische Vervielfältigung führte zu PCR-Fragmenten von 441 bp (cDNA) und 895 bp (genomisch) für β -Aktin, 912 bp (cDNA) und 2329 bp (genomisch) für *Tas1r2* und 383 bp (cDNA) und 3860 bp (genomisch) für *Opsin mws*. Als Positivkontrolle diente genomische DNA der C57BL/6-Maus. Die Illustration der PCR-Produkte erfolgte mittels Ethidiumbromid nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarosegel.

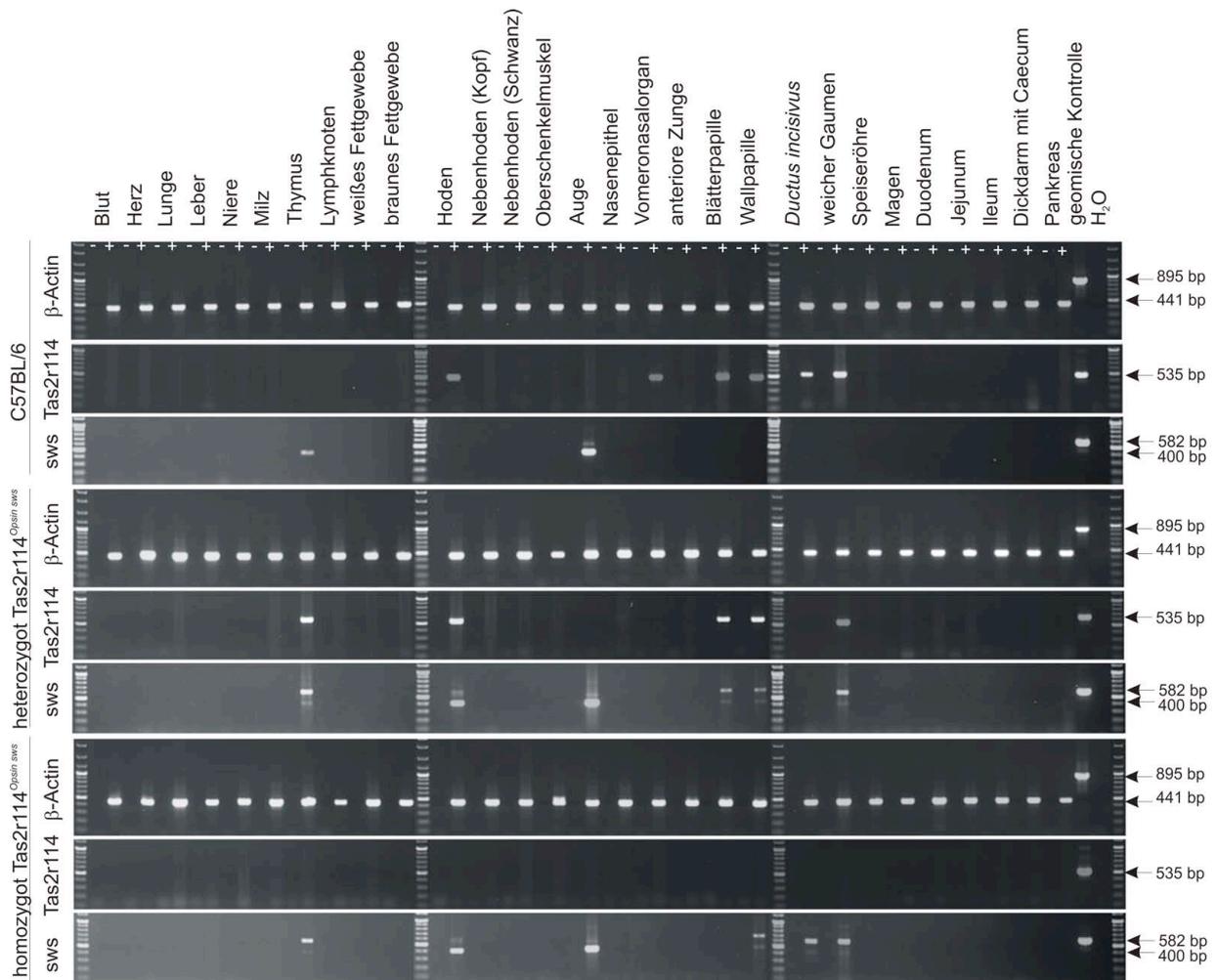


Abb. 8.5. RT-PCR basierter Nachweis des *Tas2r114*-Knockouts und des *Opsin sws*-Knockins in *Tas2r114*^{*Opsin sws*}-Mäusen im Vergleich zur *C57BL/6*-Maus. Isolierte RNA aus Geweben der *C57BL/6* und einer heterozygoten bzw. homozygoten *Tas2r114*-Maus wurde in cDNA umgeschrieben und als Template für die Amplifikation von β -Aktin, *Tas2r114* und *Opsin sws* (short wavelength sensitive) eingesetzt. Die Amplifikation von cDNA bzw. genomischer DNA führte zu PCR-Fragmenten von 441 bp (cDNA) und 895 bp (genomisch) für β -Aktin, von 535 bp für *Tas2r114* und 400 bp (cDNA) bzw. 582 bp (genomisch) für *sws*. Als Positivkontrolle diente genomische DNA der *C57BL/6*-Maus. Die Illustration der PCR-Produkte erfolgte mittels Ethidiumbromid nach elektrophoretischer Auftrennung im 1 %igen Agarosegel.

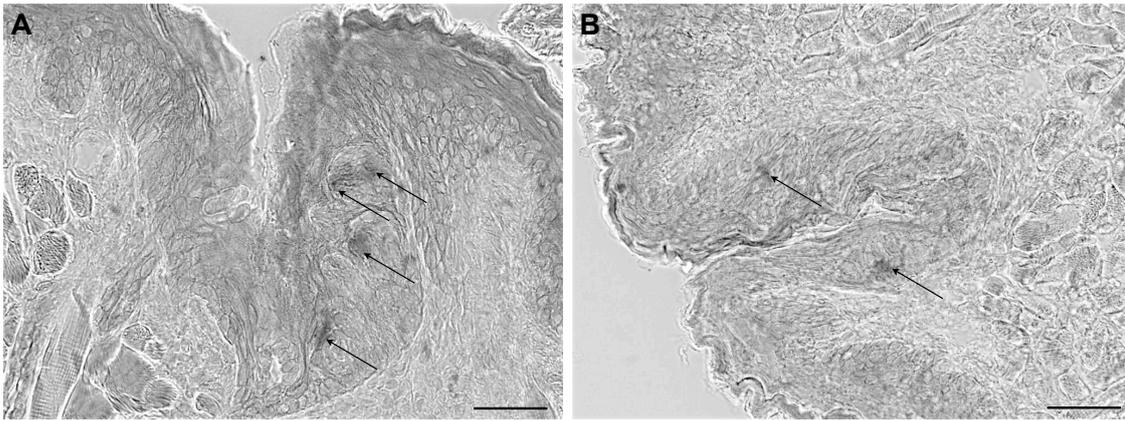


Abb. 8.6. RNA-Expressionsanalyse des Bitterrezeptors *Tas2r105* in Nachkommen der *Tas2r114^{Op sin sws}*-Linie. Die Hybridisierung von Gewebeschnitten (14 μm) der Blätterpapille von (A) Wildtyp-Tieren und (B) homozygoten *Tas2r114*-Knockout-Tieren mit einer *Tas2r105*-antisense-Sonde führte in Abhängigkeit des Genotyps zu unterschiedlich vielen Markierungen in den Geschmacksknospen der Papille. Maßstab: 20 μm .

9 Danksagung

Diese Arbeit wurde dank der Hilfe und Unterstützung zahlreicher Menschen realisiert, bei denen ich mich an dieser Stelle bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof, der mir jederzeit mit fachlichen Hinweisen und praktischen Ratschlägen zur Seite stand und mich bei immer wieder auftretenden Sackgassen auf den richtigen Weg führte. Auch sei an dieser Stelle für das Vertrauen gedankt, mich in so vielen unterschiedlichen Arbeitsfeldern austoben zu dürfen.

Weiterhin sei Dr. Anja Voigt sowie Dr. Ulrich Boehm und PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer vom Zentrum für Molekulare Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (ZMNH) für die hilfreichen Tipps und anregenden Diskussionen gedankt, die mir insbesondere den Einstieg ins transgene „Maus-Business“ erleichterten.

PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer und Sarah Homann von der „Transgenen Mauseinheit“ des ZMNH gilt auch ein ganz besonderen Dank für die unermüdliche und zuverlässige Unterstützung bei den embryonalen Stammzellen, die weder Tageszeit noch Wochenende kannte. Für diese großartige Zusammenarbeit herzlichen Dank.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Katja Riedel mit der ich zahlreiche Abende im Labor verbracht habe. Vielen Dank für deinen langen Atem bei den „paar“ Oozytenexperimenten und deiner enormen Unterstützung bei den Tücken mit dem OpusXpress und widerspenstigen Elektroden.

Mein Dank gilt an dieser Stelle auch Stefanie Demgensky für die unzähligen Injektionen der Oozyten – wir beide wissen wie viele injizierte Oozyten es für eine Messung bedurfte – und Dr. Frauke Stähler für die hilfreichen und anregenden Diskussionen weit über das Oozytenfeld hinaus.

Ganz herzlich danke ich auch Elke Chudoba für ihr unermüdliches Engagement, ihre tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher funktioneller Experimente und ihren ungebrochenen Optimismus. Danke, dass mit dir nichts unmöglich war, auch wenn uns unser Umfeld für den Umfang unserer Experimente für verrückt erklärte.

Ebenfalls sei an dieser Stelle Dr. Anne Brockhoff gedankt, die im letzten Jahr dieser Arbeit mit ihrer Unterstützung in der Zellkultur ganz Wesentlich zur Durchführung vieler Experimente und zur Schonung meines angeschlagenen Handgelenkes beigetragen hat.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch den Tierpflegern und Mitarbeitern der Tierhaltungen am ZMNH und MRL. Insbesondere danke ich Dr. Reinhart Kluge, Dr. Beate Liehl, Dr. Stephanie Krämer und Elke Thom für die Hilfestellungen und Unterstützung bei der Anfertigung von Anträgen und Umsetzung tierexperimenteller Arbeiten. Weiterhin gilt mein Dank den Tierpflegern Ali Derin und Susanne Conrad für die fürsorgliche Versorgung der generierten Mäuse in Hamburg sowie Stephanie Sartig, Viviane Hass, Jasmin Mattern, Christin Jungnickel, die diese Aufgabe im MRL übernahmen. Auch sei an dieser Stelle herzlich Ines Grüner für die Durchführung der morgendlichen Frosch-OPs gedankt.

Robert Kuhnert, Ellen Schöley-Pohl, Michaela Letz und Stefanie Demgensky danke ich für die Unterstützung bei den Genotypisierungen der Mauslinien. Sandra Hübner gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Gewebeentnahme und die Durchführung der Epithelisolierung sowie der quantitativen RT-PCRs.

Weiterhin danke ich Natacha Roudnitzky für ihre Hilfe sich im Dschungel der Statistik zurechtzufinden und Dr. Peng Shi für die Bereitstellung der Bitterrezeptorsequenzen.

Ein großes Dankeschön geht auch an PD Dr. Franz Bartl für die Bereitstellung des 11-*cis*-Retinals und die hilfreichen Antworten bei den unerwarteten Ergebnissen mit all-*trans*-Retinal.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich meinen Kollegen der „Maus-AG“ Anja, Sandra, Sabine und Jonas für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre aussprechen. Des Weiteren danke ich meinen zwei „Langzeitpraktikanten“ Florian Padberg und Anna Tesouro, die mich im Zuge ihres Praktikums sehr unterstützten und das Prädikat „Musterpraktikanten“ verdienen.

Nicht zuletzt danke ich allen Kollegen der Abteilung Molekulare Genetik, die meinen Weg in den letzten Jahren begleitet haben und den Korrekturlesern dieser Arbeit für ihre konstruktiven Kritiken.

Abschließend gilt mein Dank meinen Eltern, die mir immer motivierend und unterstützend zur Seite standen und so manches Mal in den letzten Jahren – insbesondere während der Anfertigung dieser Arbeit – meinen Kühlschrank vor gähnender Leere retteten, wenn die Welt vor Arbeit versank.

10 Eigenständigkeitserklärung

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

Potsdam, August 2011

Kristina LoBow