

Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke
Abteilung Molekulare Genetik

Molekulare Grundlagen der Bittergeschmacks- wahrnehmung in der Maus

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

in der Wissenschaftsdisziplin „Molekularbiologie“

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von

Sandra Hübner

Potsdam, September 2014

Online veröffentlicht auf dem
Publikationsserver der Universität Potsdam:
URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77720
<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-77720>

Publikationen	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Was ist Geschmack?	1
1.2 Anatomische und physiologische Grundlagen des Geschmackssinns von Säugern	2
1.2.1 Morphologie von Geschmackspapillen und -knospen	2
1.2.2 Zelltypen der Geschmacksknospen und deren Funktionen	3
1.2.2.1 Typ I-Zellen	4
1.2.2.2 Typ II-Zellen (oder Geschmacksrezeptorzellen)	5
1.2.2.3 Typ III-Zellen (oder Präsynaptische Zellen)	6
1.2.2.4 Basalzellen (oder Typ IV-Zellen).....	7
1.2.2.5 Signalübertragungsmechanismen der Typ II-Zellen (Geschmacksrezeptorzellen)	7
1.2.2.6 Weitere interzelluläre Kommunikation in der Geschmacksknospe	8
1.2.3 Weiterleitung und Verarbeitung von Geschmacksinformationen	8
1.3 Geschmacksqualität – bitter und ihre Rezeptoren.....	10
1.3.1 Bitterstoffe	10
1.3.2 Bittergeschmacksrezeptoren	11
1.3.3 Bitterstoff-Detektion und Rezeptor-Interaktion bei Säugern	12
1.3.4 Bitterrezeptor-Gene von Maus und Mensch	14
1.3.5 Tas2r-Expression.....	16
1.3.5.1 Extraorale Bitterrezeptoren	16
1.3.5.2 Orale Bitterrezeptoren und Konditionen für ein Bitterstoff-Unterscheidungsvermögen	19
1.4 Zielstellung der Arbeit.....	21
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Materialien	23
2.1.1 Chemikalien	23
2.1.2 Antiseren und Farbstoffe.....	23
2.1.3 Enzyme.....	24
2.1.4 Kits und Gebrauchslösungen	24
2.1.5 Größenstandards	25
2.1.6 Plasmide	25

2.1.7 Oligonukleotide	26
2.1.8 Lösungen und Puffer	32
2.1.9 Futtermittel	32
2.1.10 Versuchstiere	32
2.1.10.1 Tas2r131 ^{BL-IRES-hrGFP} (Tas2r131 ^{BLiG}).....	32
2.1.10.2 Tas1r1 ^{BL-IRES-mCherry} (Tas2r131 ^{BLiR}).....	32
2.1.10.3 Tas2r131 ^{F/MBLF/M-IRES-Cre} (Tas2r131 ^{BLiC}).....	33
2.1.10.4 R26:lacZ/DT-A (R26 ^{DTA}).....	33
2.1.11 Verbrauchsmaterialien/-lösungen und Zubehör	33
2.1.12 Geräte und Gebrauchswaren	34
2.1.13 Fluoreszenzfilter-Sets.....	36
2.1.14 Software	36
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1 Standard-PCR.....	37
2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese (AGE).....	37
2.2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	38
2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
2.2.1.5 Sequenzierung	38
2.2.1.6 Genotypisierung von Mäusen.....	38
2.2.2 Haltungs- und Zuchtbedingungen von Versuchstieren	39
2.2.3 <i>In-vitro</i> -Expressionsanalysen	40
2.2.3.1 Gewebeentnahme zum Nachweis von mRNA mittels RT-PCR.....	40
2.2.3.2 RNA-Isolation	42
2.2.3.3 cDNA-Synthese.....	42
2.2.3.4 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR).....	43
2.2.3.5 Quantitative Reverse Transkription-PCR (qRT-PCR)	44
2.2.4 <i>In-situ</i> -Expressionsanalysen.....	49
2.2.4.1 Perfusion von Versuchstieren und Gewebepreparation	49
2.2.4.2 Anfertigung von Gefriergewebeschnitten.....	49
2.2.4.3 Isolation von Maus-Spermatozoen	50
2.2.4.4 Visualisierung von (Marker-)Fluoreszenzen innerhalb der Gewebe.....	50
2.2.4.5 Immunhistochemischer Nachweis von α -Gustducin mittels Antikörperfärbung.....	51
2.2.4.6 <i>In-situ</i> -Hybridisierung	52
2.2.4.7 Dokumentation und statistische Auswertung	58
2.2.4.8 Isolation und Darstellung des Zungen- bzw. Gaumenepithels	59
2.2.5 Funktionelle Analysen	61
2.2.5.1 Einzelzell- <i>Calcium-Imaging</i>	61

3	Ergebnisse	65
3.1	Expressionsorte von Maus-Bitterrezeptoren	65
3.1.1	Nachweis von Tas2r-mRNA in Maus-Geweben	66
3.1.2	Visualisierung von Tas2r131 exprimierenden Zellen	68
3.1.2.1	Nichtgustatorische Maus-Gewebe	68
3.1.2.2	Zungenepithel.....	70
3.1.2.3	Gaumenepithel	71
3.1.3	Bitterrezeptor-Expression in Zungenpapillen	72
3.1.3.1	Quantitative mRNA-Analyse der Tas2r in Zungengeweben und Blut	72
3.1.3.2	Zelluläre Tas2r-mRNA-Analyse in der Wallpapille mittels <i>ISH</i>	79
3.2	Expressionsmuster von Maus-Bitterrezeptoren in Geschmacksrezeptorzellen	81
3.2.1	Analysen in Mäusen mit Fluoreszenzreporter für Tas2r131	81
3.2.1.1	Zelluläre hrGFP-Expression im Vergleich zu α -Gustducin	81
3.2.1.2	Quantitative mRNA-Analyse der Tas2r in Zungengewebe	84
3.2.1.3	Zelluläre Tas2r-mRNA-Expression in der Wallpapille mittels <i>ISH</i>	85
3.2.2	Analysen in Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen im Vergleich zu Kontrollen	89
3.2.2.1	Sensitivitätsanalyse für Endpunkt-PCR-Reaktionen zum Nachweis verschiedener Tas2r-mRNA	89
3.2.2.2	Nachweis der mRNA ausgewählter Tas2r in Zungengewebe von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen	91
3.2.2.3	Quantitative mRNA-Analyse der Tas2r in Zungengewebe von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen	93
3.2.2.4	Zelluläre Tas2r-mRNA-Expression in der Wallpapille von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen mittels <i>ISH</i>	101
3.2.3	Funktionelle Analyse isolierter Bittergeschmacksrezeptorzellen der Maus mittels Einzelzell- <i>Calcium-Imaging</i>	106
4	Diskussion	109
4.1	Expressionsorte von Maus-Bitterrezeptoren	110
4.1.1	Expressionsorte von Tas2r131	110
4.1.1.1	Tas2r131 in gustatorischen Geweben	110
4.1.1.2	Tas2r131 in extragustatorischen Geweben.....	111
4.1.2	Expressionsorte von Tas2r108	116
4.1.2.1	Tas2r108 in extragustatorischen Geweben.....	117
4.1.2.2	Tas2r108 in gustatorischen Geweben	118
4.1.3	Tas2r-Expression in Blut & nichtgustatorischem Zungenepithel	119
4.1.3.1	Blut.....	119
4.1.3.2	Nichtgustatorisches Zungenepithel.....	121

4.1.4	Tas2r-Expression in Geschmackspapillen der Zunge	122
4.2	Expressionsmuster von Maus-Bitterrezeptoren in Geschmacksrezeptorzellen	126
4.2.1	Tas2r131 innerhalb der Geschmacksrezeptorzellen	126
4.2.1.1	Bi-allelische Expression	126
4.2.1.2	Tas2r131 exprimierende Zellen als Subpopulation aller Bittergeschmacksrezeptorzellen	127
4.2.1.3	Tas2r-Ko-Expression mit Tas2r131	128
4.2.2	Definierte Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen	131
4.2.2.1	Vergleich: mRNA-Expressionslevel und -Expressionshäufigkeit.....	132
4.2.2.2	Wie viele Tas2r könnten in einer Bitterzelle vorkommen?.....	133
4.2.2.3	Häufigkeit individueller Tas2r innerhalb der Bitterzellpopulation	134
4.2.3	Geordnete und regulierte Tas2r-Ko-Expression?	135
4.2.3.1	Evolutionärer Hintergrund.....	135
4.2.3.2	Transkriptionelle Regulation?	136
4.2.3.3	Zeitliche Regulation?	136
4.3	Bitter-Unterscheidungsvermögen von Mäusen.....	137
4.3.1	Bitter-Unterscheidung auf Geschmacksrezeptorzell-Ebene	137
4.3.2	Bitter-Unterscheidung auf höheren Ebenen und im Verhalten.....	138
4.3.2.1	Auswirkungen einer Tas2r131-Zellablation auf das Bittergeschmacksverhalten von Mäusen	138
4.3.2.2	Mögliche Kontroversen.....	141
4.3.2.3	Ansätze zur Verschlüsselung der Bitter-Geschmacksinformationen ...	142
4.3.3	Konsequenzen	143
5	Zusammenfassung	145
6	Literaturverzeichnis.....	147
7	Anhang	161
	Danksagung	i
	Selbständigkeitserklärung	iii

Publikationen

Artikel – Abteilung Molekulare Genetik

A. Voigt, S. Hübner, K. Lossow, I. Hermans-Borgmeyer, U. Boehm, W. Meyerhof (2012)
Genetic labeling of Tas1r1 and Tas2r131 taste receptor cells in mice.
Chem Senses. 37(9):897–911. doi: 10.1093/chemse/bjs082. Epub 2012 Sep 25.

S. Prandi, M. Bromke, S. Hübner, A. Voigt, U. Boehm, W. Meyerhof, M. Behrens (2013)
A Subset of Mouse Colonic Goblet Cells Expresses the Bitter Taste Receptor Tas2r131.
PLoS ONE 8(12): e82820. doi:10.1371/journal.pone.0082820

Artikel – Kooperationen

D. Meyer, A. Voigt, P. Widmayer, H. Borth, S. Huebner, A. Breit, S. Marschall, M.H. de Angelis, U. Boehm, W. Meyerhof, T. Gudermann, I. Boekhoff (2012)
Expression of Tas1 taste receptors in mammalian spermatozoa: functional role of Tas1r1 in regulating basal Ca²⁺ and cAMP concentrations in spermatozoa.
PLoS One. 7(2): e32354. doi: 10.1371/journal.pone.0032354. Epub 2012 Feb 29.

Y. Kusuhara, R. Yoshida, T. Ohkuri, K. Yasumatsu, A. Voigt, S. Hübner, K. Maeda, U. Boehm, W. Meyerhof, Y. Ninomiya (2013)
Taste responses in mice lacking taste receptor subunit T1R1.
J Physiol. 591(Pt 7):1967–85. doi: 10.1113/jphysiol.2012.236604. Epub 2013 Jan 21.

Übersichtsartikel

S. Hübner, J. Töle, W. Meyerhof (2013)
Taste and nutrition. 3. Development of taste preferences and aversions.
Ernaehrungs Umschau international 60(12): 222–227. doi: 10.4455/eu.2013.042

Abkürzungsverzeichnis

Ace	Acesulfam K		Ethylendiamintetraessigsäure bzw.
AP	Alkalische Phosphatase	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Arb	Arbutin	FAM	6-FAM-phosphoramidit, auch 6-FAM-amidit
ATP	Adenosintripphosphat	FoP	Blätterpapillen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (chromogenes Substrat für das Enzym Alkalische Phosphatase)	FuP	Pilzpapille(n)
BL	englisch <i>barley lectin</i> , deutsch Gerstenlektin	GABA	γ -Aminobuttersäure
BL/6	siehe C57BL/6	α -Gustducin	alpha-Untereinheit des trimären G-Proteins, Gustducin
C57BL/6	“C57 black 6” Inzucht-Mausstamm	Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Ca ²⁺	Calcium-Ionen	GG	lat. <i>Ganglion geniculatum</i>
CCD	<i>Charge-coupled Device</i>	GN	lat. <i>Ganglion nodosum</i>
CDN	Kanada	GP	lat. <i>Ganglion petrosum</i>
cDNA	englisch <i>complementary DNA</i> , deutsch komplementäre DNA	GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon, auch Gonadoliberin
CT	lat. <i>Chorda tympani</i> , Ast des VII. Hirnnervs	GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
Cuc	Cucurbitacin I	G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Cyx	Cycloheximid	hrGFP	engl. <i>Humanized renilla green fluorescent protein</i>
cre	englisch <i>cyclization recombination</i>	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
D	Deutschland	IHC	Immunhistochemie (Antikörperfärbung)
Den	Denatoniumbenzoat	IRES	engl. <i>Internal ribosomal entry site</i> , deutsch interne ribosomale Eintrittsstelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat	ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
DIG	Digoxigenin: Cardenolid (Steroid) aus den Blättern des Fingerhuts <i>Digitalis purpurea</i>	M	Marker
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mCherry	monomeres <i>Cherry</i> -Protein
DNase	Deoxyribonuklease	<i>mcherry</i>	Gen des monomeren <i>Cherry</i> -Proteins
dNTPs	Desoxiribunukleotide	Mg ²⁺	Magnesium-Ionen
DTA	Diphtherietoxin A	mRNA	englisch <i>messenger RNA</i> , deutsch Boten-RNA
DTT	Dithiothreitol		

n	Anzahl
NID	englisch <i>naso-incisor duct</i> (Gang zwischen Nasenhöhle und Gaumen)
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (Redox-Farbstoff)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPG	lat. <i>Ganglion nodosum/petrosum</i>
NPM	lat. <i>Nervus petrosus major</i> , Ast des VII. Hirnnerv
NTPDase	Nukleosidtriphosphat-Dephosphohydrolase
NTS	lat. <i>Nucleus tractus solitarii</i>
Pap	Papaverinhydrochlorid
PbN	lat. <i>Nucleus parabrachialis</i>
PBS	englisch <i>phosphate buffered saline</i> , deutsch Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	1,4-Piperazindiethan-Sulfonsäure
Plc β 2	Phospholipase C β 2
POD	Peroxidase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PROP	6- <i>n</i> -Propylthiouracil
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkription-PCR
Qui	Chinin(hydrochlorid)
RNA	Ribonukleinsäure
Rosa	engl. <i>Reverse orientated splice acceptor</i>
rpm	engl. <i>Rounds per minute</i> , deutsch Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
Sal	Salicin
SD	engl. <i>Standard deviation</i> , deutsch Standardabweichung

X

SDS	engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , deutsch Natriumdodecylsulfat
SE	engl. <i>Standard error</i> , deutsch Standardfehler
Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
Snap25	synaptosomal-assoziiertes Protein von 25 kDa
SCC	engl. <i>Solitary chemosensory cell</i>
TAM	TAMRA, Tetramethylrhodamin
Tas1r1	muriner Geschmacksrezeptor Typ1 Mitglied 1
Tas1r2	muriner Geschmacksrezeptor Typ1 Mitglied 2
Tas1r3	muriner Geschmacksrezeptor Typ1 Mitglied 3
TAS2R	humaner Geschmacksrezeptor Typ 2; Bitter(geschmacks)rezeptor
Tas2rX	muriner Geschmacksrezeptor Typ 2 Mitglied X; Bitter(geschmacks)rezeptor
τ GFP	engl. <i>Tau-green fluorescent protein</i>
tdRFP	engl. <i>Tandem-dimer red fluorescent protein</i>
TG	Trigeminalganglion
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, auch Tromethamin, Trometamol
TRPM5/Trpm5	engl. <i>transient receptor potential cation channel subfamily M member 5</i>
TSA	<i>Tyramide Signal Amplification</i>
U	<i>Unit</i> , Einheit der katalytischen Aktivität
VNO	<i>Vomeronasalorgan</i>
VP	Wallpapille
VP+FoP	Wall- und Blätterpapillengewebe
v/v	engl. <i>volume per volume</i> , deutsch Volumenprozent
w/v	engl. <i>weight per volume</i> , deutsch Gewicht pro Volumen
w/w	engl. <i>weight per weight</i> , deutsch Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Was ist Geschmack?

Verwendet man im deutschen Sprachgebrauch den Ausdruck „Geschmack“ einer konsumierten Nahrung, so ist oft eher ein komplexer Sinneseindruck gemeint, der im Englischen mit dem wohl viel treffenderen Begriff „flavor“ beschrieben wird (Behrens, Voigt *et al.* 2013). In der Mundhöhle erfasst z. B. die trigeminale Wahrnehmung Beschaffenheit und Temperatur von Lebensmitteln und erkennt Reizstoffe, die etwa mit dem Attribut „scharf“ beschrieben werden. Der Geruchssinn beeinflusst schon vor der Nahrungsaufnahme unsere Einschätzung des Lebensmittels, wie beispielsweise ob es verdorben stinkt. Außerdem wirkt er während des Essens beim Geschmackempfinden wesentlich mit. Auch helfen Seh-, Tast- und Gehörsinn bereits vor dem Verzehr von Nahrungsmitteln diese zu beurteilen. Ein gutes Beispiel hierfür bildet Obst, bei dem Färbung, Weichheit oder auch das Geräusch beim Darauf-Klopfen uns einen Hinweis auf dessen Reife geben. Aus all den verschiedenen Sinneseindrücken konstruiert das Gehirn einen Gesamtgeschmackseindruck.

Der Geschmackssinn, einzeln betrachtet, steuert das angeborene reflexartige Nahrungsaufnahme- und Ablehnungsverhalten. Bei Säugern beschreibt er die Wahrnehmung der fünf bisher wissenschaftlich anerkannten Grundgeschmacksqualitäten: süß, umami, salzig, sauer und bitter. Dabei werden jeder dieser Geschmacksmodalitäten spezielle biologische Funktionen zugeordnet. Um Nahrungsbedürfnisse zu befriedigen, können hochkalorische Nahrungsmittel durch deren Süß- oder Umamigeschmack detektiert werden (Lindemann 1996). So ist Süßes kohlenhydratreich und kann als schnelle Energiequelle dienen (Chaudhari und Roper 2010). Umami, der Geschmack von Glutamat und einigen anderen Aminosäuren, deutet auf einen hohen Protein-Gehalt in der Nahrung hin. Dem Salzgeschmack werden wichtige physiologische Funktionen bei der Regulation des Wasser-Elektrolyt-Haushalts und bei der Aufrechterhaltung der Blutzirkulation zugeschrieben. Sauergeschmack signalisiert die Anwesenheit von Säuren in der Nahrung. Weil diese Geschmacksqualität generell als abstoßend empfunden wird, bewirkt sie ein Vermeiden der Aufnahme stark säurehaltiger Nahrung, wie zum Beispiel verdorbener Lebensmittel. Auch Bitteres wird im Allgemeinen als abstoßend empfunden und deshalb vermieden. Nichtsdestotrotz lernen Menschen mit der Zeit sauer oder bitter schmeckende Nahrung zu akzeptieren, oder sogar zu mögen und damit die angeborenen Verhaltensweisen zu überwinden. Die Existenz weiterer Geschmacksqualitäten, wie z. B. „fettig“ (Cartoni, Yasumatsu *et al.* 2010; Galindo, Voigt *et al.* 2012), wird diskutiert.

1.2 Anatomische und physiologische Grundlagen des Geschmackssinns von Säugern

Die morphologischen Strukturen zur Geschmackserkennung von Säugetieren befinden sich in deren Mundhöhle. Die sogenannten Geschmacksknospen sind Aggregate von 50 bis zu 150 spezialisierten Zellen (Chandrashekar, Hoon *et al.* 2006) und kommen in der Zunge, im weichen Gaumen, im Rachen (*Pharynx*) und dem Kehldeckel vor, sowie vermutlich auch im oberen Ösophagus (Miller 1995). In Nagern sind Geschmacksknospen außerdem im Gang zwischen Nasenhöhle und Gaumen, dem *Ductus nasopalatinus*, (NID [englisch: *naso-incisor duct*]) zu finden (Miller und Spangler 1982).

1.2.1 Morphologie von Geschmackspapillen und -knospen

In der Säuger-Zunge treten Geschmacksknospen überdies in spezialisierten Organen, den Papillen (*Papillae linguales*), konzentriert auf. So findet man drei Typen von Geschmackspapillen unterschiedlich auf der Zungenoberfläche verteilt (Miller 1995).

Pilzpapillen (*Papillae fungiformes*) sind die morphologisch einfachsten Geschmackspapillen, die sich als Ausstülpungen des Zungenepithels präsentieren. Sie sind am zahlreichsten an der Zungenspitze zu finden und verteilen sich dorsal abnehmend über etwa zwei Drittel der Zungenoberseite. Mäuse, zum Beispiel, weisen diesen Papillen-Typ auch an der Zungenunterseite, jedoch nur ganz vorn an deren Spitze auf. Ein Mensch besitzt insgesamt annähernd 300 Pilzpapillen (Arvidson 1979; Cheng und Robinson 1991), die Maus etwa 80 (Voigt, Hübner *et al.* 2012). Während der Mensch durchschnittlich ca. drei Geschmacksknospen pro Pilzpapille, aufweist (Miller 1986; Cheng und Robinson 1991), besitzen Mäuse nur eine Geschmacksknospe je Pilzpapille.

Blätterpapillen (*Papillae foliatae*) befinden sich am hinteren Zungenrand. Sie stellen grabenförmige, ovale Einstülpungen mit Erhöhungen des Zungenepithels dar. Beim Menschen findet man zwei bis neun dieser Gräben, die jeweils etwa 120 Geschmacksknospen enthalten (Miller 1995; Meyerhof 2005). Mäuse hingegen besitzen etwa drei bis fünf Blätterpapillen je Seite (eigene Beobachtung), welche rund 180 Geschmacksknospen beherbergen (Voigt, Hübner *et al.* 2012).

Die Wallpapille (*Papilla [circum-] vallatae*) stellt den größten Typ von Geschmackspapillen dar und kommt in deutlich variierender Anzahl in den verschiedenen Säuger-Spezies vor. Eine humane Zunge z. B. beherbergt am hinteren Zungengrund vier bis 18 solcher Strukturen, welche als kreisförmig geschlossene Gräben in einer umgekehrt V-förmigen Linie angeordnet sind (siehe Abbildung 1; Miller 1995; Meyerhof 2005). Diese beinhalten jeweils ungefähr 250 Geschmacksknospen. Mäuse hingegen haben nur eine einzige Wallpapille, die sich mittig am hinteren Zungengrund befindet (Meyerhof 2005). Sie kann bis zu rund 300 Geschmacksknospen enthalten (Voigt, Hübner *et al.* 2012).

1 Einleitung

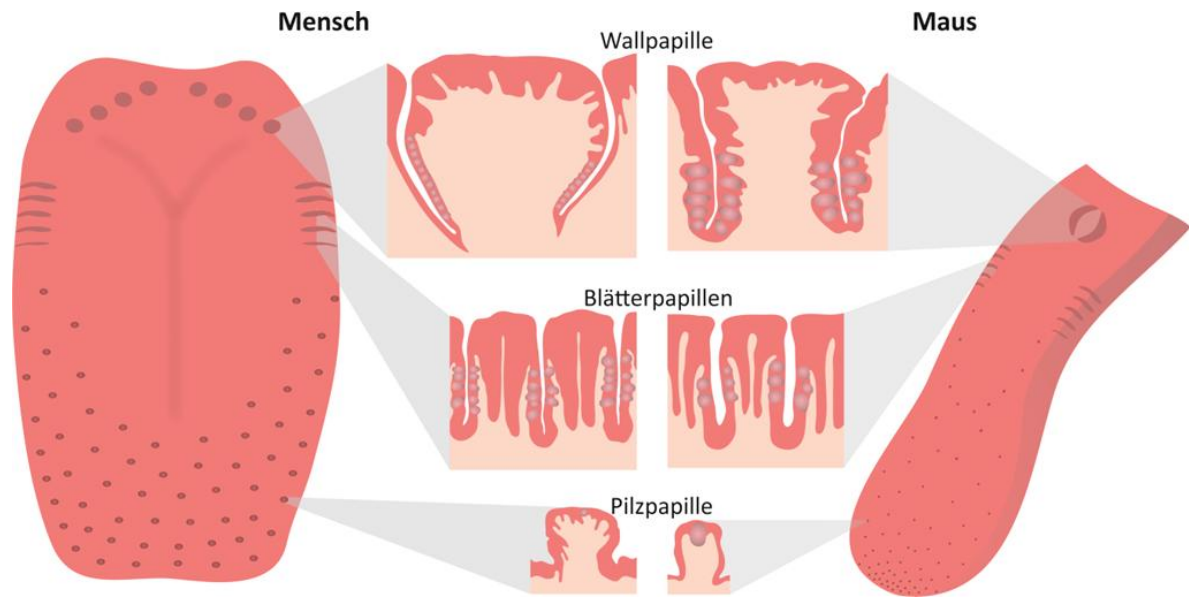


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Lage und Morphologie der Zungen-Geschmackspapillen von Mensch (links) und Maus (rechts). Im Zungenepithel von Mensch und Maus existieren drei verschiedene Arten von Papillen, die Geschmacksknospen enthalten. Im vorderen Bereich der Zunge sind die Pilzpapillen lokalisiert, am hinteren Zungenrand die oval geformten Gräben der Blätterpapillen, sowie am hinteren Zungenrand die bei Mensch und Maus morphologisch sich unterscheidenden Wallpapille(n). Beim Menschen findet man mehrere kreisrunde Wallpapillen, bei Mäusen nur eine aus zwei halbmondförmigen Gräben bestehende. Weiter sind schematisch vergrößerte koronale Querschnitte durch die einzelnen Geschmackspapillen gezeigt. Zungen sowie Querschnitts-Darstellung von Mensch und Maus sind dabei nicht im korrekten Größenverhältnis zueinander dargestellt. (Abbildung modifiziert nach Jonas Töle)

Zur Vollständigkeit sei an dieser Stelle auch der vierte Zungenpapillen-Typ, die Fadenzpapillen (*Papillae filiformes*), genannt. Diese sind über die gesamte Zungenoberfläche verteilt, gehören jedoch nicht zu den Geschmackspapillen, da sie keine Geschmacksknospen aufweisen (Jung, Akita *et al.* 2004).

Drüsengänge der in der Zunge gelegenen *von Ebner*-Drüsen sekretieren Speichel (*Saliva*) in die Gräben der Blätter- und Wallpapillen (Meyerhof 2005). Somit entsteht an der apikalen Seite der Geschmacksknospen ein Milieu, in welchem Geschmacksstoffe gelöst und zur dort gelegenen Öffnung der Geschmacksknospe (*Porus gustatorius*) transportiert werden können. In diese kleine Öffnung wiederum ragen die apikalen Enden von zwiebelartig zusammengesetzten Zellen. Diese erneuern sich recht häufig, in Mäusen und Ratten durchschnittlich alle zehn bis elf Tage (Beidler und Smallman 1965; Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013).

1.2.2 Zelltypen der Geschmacksknospen und deren Funktionen

Grundsätzlich lassen sich die spezialisierten Zellen innerhalb der Geschmacksknospen morphologisch charakterisieren und wurden somit einst in diverse Zelltypen unterteilt (Murray 1993; Pumplun, Yu *et al.* 1997). Auf dieser Grundlage bestätigten sich später auch funktionell divergente Arten von Zellen, was zu einer bis heute akzeptierten Unterscheidung von vier verschiedenen Zelltypen führte (Chaudhari und Roper 2010;

Behrens und Meyerhof 2011). Inzwischen konnte darüber hinaus in Mäusen gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Zelltypen auch in ihrer Lebensdauer variieren (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013). Weitere bisher vorliegende Erkenntnisse über die verschiedenen Geschmacksknospenzellen wurden vornehmlich in Nager-Modellen erlangt.

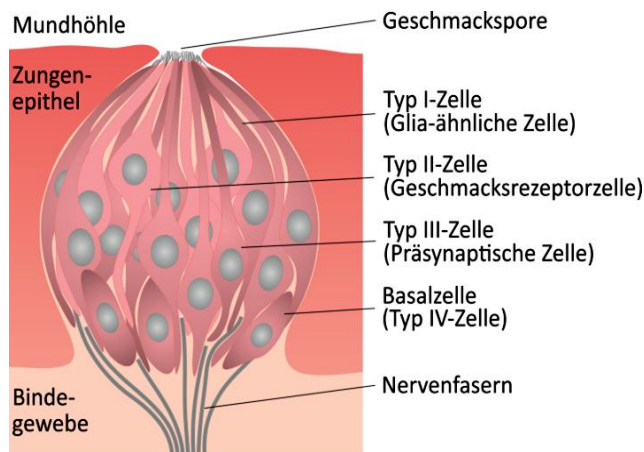


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Morphologie einer Säuger-Geschmacksknospe. Die ins Zungenepithel eingebettete Geschmacksknospe besteht aus vier Grund-Zelltypen: Typ I-Zellen, Typ II-Zellen, Typ III-Zellen und Basalzellen. An der apikalen Seite der Geschmackssinneszellen befindliche Mikrovilli ragen in die Geschmackspore. Dort findet der direkte Kontakt der Geschmacksstoffe der Mundhöhle mit Geschmacksrezeptoren statt. Afferente Nervenfasern innervieren die Geschmacksknospe und leiten Geschmacksinformationen zum zentralen Nervensystem. (Abbildung modifiziert nach Jonas Töle)

1.2.2.1 Typ I-Zellen

Typ I-Zellen repräsentieren die am häufigsten vorkommenden Zellen innerhalb der Geschmacksknospen und umhüllen andere Zellen (Chaudhari und Roper 2010). In Elektronenmikroskop-Aufnahmen erscheinen sie wegen der hohen Dichte ihres Zytoplasmas dunkel (Pumplin, Yu *et al.* 1997). Typ I-Zellen exprimieren den, auch in Gliazellen des Nervensystems vorkommenden, Glutamat-Aspartat-Transporter, GLAST, der vermutlich an der Aufnahme oder Umwandlung des Transmitters Glutamat in Typ I-Zellen beteiligt ist (Lawton, Furness *et al.* 2000). Deshalb wird eine unterstützende Funktion dieser Zellen vermutet, ähnlich der der Gliazellen. Überdies exprimieren Typ I-Zellen die Ecto-ATPase, NTPDase2 (Nukleosidtriphosphat-Dephosphohydrolase-2), welche extrazelluläres ATP hydrolysiert (Barry 1992; Bartel, Sullivan *et al.* 2006; Vandenbeuch, Anderson *et al.* 2013). Es wurde gezeigt, dass ATP in Geschmacksknospen als Neurotransmitter agiert (Finger, Danilova *et al.* 2005). Somit könnten Typ I-Zellen innerhalb der Geschmacksknospen also in die Beendigung dessen Übertragung und in das Verhindern der Ausbreitung von Neurotransmittern involviert sein, vergleichbar mit den Gliazellen (Chaudhari und Roper 2010). Außerdem exprimieren Typ I-Zellen ROMK2, einen Kaliumkanal (engl.: *renal outer potassium [K] channel*), welcher vermutlich Kaliumionen in die apikale Öffnung exkretiert und damit erregbaren Geschmackszellen ermöglicht ein hyperpolarisiertes Membranpotential aufrechtzuerhalten (Jeon, Zhu *et al.* 2008). Zusätzlich zu all diesen unterstützenden Funktionen scheinen Typ I-Zellen auch Amilorid-empfindliche Natriumionenkanäle zu exprimieren und wären somit in die attraktive Salzgeschmackswahrnehmung involviert (Vandenbeuch, Clapp *et al.* 2008).

1.2.2.2 Typ II-Zellen (oder Geschmacksrezeptorzellen)

Typ II-Zellen besitzen eine geringere Elektronen-Dichte und erscheinen deshalb in Elektronenmikroskop-Aufnahmen hell (Pumplin, Yu *et al.* 1997). Sie werden auch Geschmacksrezeptorzellen genannt, da sie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) zur Detektion von süßen, umami und bitteren Stoffen exprimieren (Hoon, Adler *et al.* 1999; Roper und Chaudhari 2009). Dabei ist die gesamte Typ II-Zell-Population in Subtypen unterteilt, die jeweils nur eine der drei genannten Geschmacksqualitäten wahrnehmen. D. h., eine Geschmacksrezeptorzelle exprimiert entweder den Süß- oder den Umami-rezeptor oder Bitterrezeptoren (Nelson, Hoon *et al.* 2001; Zhang, Hoon *et al.* 2003; Mueller, Hoon *et al.* 2005). Anzumerken ist an dieser Stelle außerdem eine neuere Studie (Oka, Butnaru *et al.* 2013). Die Autoren fanden heraus, dass der aversive Salzgeschmack (Kaliumchlorid oder >300 mM Natriumchlorid) teilweise über bitter-sensitive Zellen vermittelt wird. Welche Sensoren bei der Erkennung der hochkonzentrierten Salze in den Bitterzellen eine Rolle spielen, konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden.

Zur Erkennung der attraktiven Geschmacksmodalitäten, süß und umami, existiert jeweils ein heterodimerer GPCR der Typ 1-Geschmacksrezeptor-Familie (Li, Staszewski *et al.* 2002). Der Süßrezeptor setzt sich aus den Untereinheiten der Geschmacksrezeptoren Typ 1 Mitglied 2 und Mitglied 3 (TAS1R2+TAS1R3 [human] bzw. Tas1r2+Tas1r3 [murin]) zusammen (Nelson, Hoon *et al.* 2001; Bachmanov, Reed *et al.* 2002). Der heterodimere Umamirezeptor besteht aus den Geschmacksrezeptoren Typ 1 Mitglied 1 und Mitglied 3 (TAS1R1+TAS1R3 [human] oder Tas1r1+Tas1r3 [murin]) (Nelson, Chandrashekar *et al.* 2002). Im Gegensatz zum Süßrezeptor, wird für die Umami-geschmackswahrnehmung die Existenz zusätzlicher Rezeptoren vermutet (Damak, Rong *et al.* 2003; Maruyama, Pereira *et al.* 2006; Chaudhari, Pereira *et al.* 2009), wie z. B. die des trunkierten metabotropen Glutamat-Rezeptors, *taste-mGLuR4* (Chaudhari, Landin *et al.* 2000). Zur Bittergeschmackswahrnehmung existieren in Typ II-Zellen vieler Vertebraten mehrere oder sogar etliche Sensoren, die Bittergeschmacksrezeptoren, deren Biologie im Abschnitt 1.3 genauer betrachtet wird. Sie gehören zu den Geschmacksrezeptoren Typ 2 (TAS2R [human] oder Tas2r [murin]) (Adler, Hoon *et al.* 2000; Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000; Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000).

Außerdem verfügen Typ II-Zellen zwar über spannungs-abhängige Natrium- und Kaliumionenkanäle, die für die Auslösung von Aktionspotentialen nötig sind, jedoch besitzen sie keine Synapsen oder Komponenten, um Neurotransmitter konventionell freizusetzen (Roper und Chaudhari 2009; Vandenbeuch und Kinnamon 2009). Stattdessen werden die Signale von den Geschmacksrezeptorzellen über andere Mechanismen auf andere Zellen oder sensorische afferente Nervenfasern übertragen (siehe 1.2.2.5).

Typ II-Zellen weisen überdies eine hohe *Turnover*-Rate auf. Ihre mittlere Lebensdauer (Halbwertszeit) beträgt nur acht Tage (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013).

1.2.2.3 Typ III-Zellen (oder Präsynaptische Zellen)

Typ III-Zellen sind die einzigen Geschmacksknospenzellen, die differenzierte Synapsen mit afferenten Geschmacksnervenfasern bilden (Yang, Crowley *et al.* 2000; Roper 2007). Deshalb werden sie auch Präsynaptische Zellen genannt. Bisher identifizierte potentielle Neurotransmitter der Typ III-Zellen sind Serotonin (5-HT), γ -Aminobuttersäure (GABA) und Norepinephrin (z. B. in Yee, Yang *et al.* 2001; Huang, Maruyama *et al.* 2008; Huang, Dando *et al.* 2009; Dvoryanchikov, Huang *et al.* 2011), deren (mögliche) Funktionsweisen in den Abschnitten 1.2.2.5 und 1.2.2.6 genauer betrachtet werden. Außerdem exprimieren Typ III-Zellen z. B. das neurale Zelladhäsionsmolekül, NCAM, welches auch an Synapsenbildung beteiligt ist; das synaptosomal-assoziierte Protein von 25 kDa, Snap25; und den spannungs-abhängigen Calciumkanal, α 1A (Yang, Crowley *et al.* 2000; DeFazio, Dvoryanchikov *et al.* 2006). Wie die Geschmacksrezeptorzellen, besitzen auch Typ III-Zellen spannungs-abhängige Natrium- und Kaliumionenkanäle, um Aktionspotentiale auslösen zu können (Gao, Lu *et al.* 2009; Vandenbeuch und Kinnamon 2009).

Zusätzlich zu ihren neuronalen Eigenschaften, sind Typ III-Zellen in der Lage direkt auf saure Stimuli oder kohlenstoffhaltige Lösungen zu reagieren und sind somit wahrscheinlich die Zellen, welche diese Geschmacksempfindungen detektieren (Huang, Chen *et al.* 2006; Huang, Maruyama *et al.* 2008; Chandrashekar, Yarmolinsky *et al.* 2009). Auch konnte derweil eine Beteiligung der auf sauer reagierenden Zellen an der Vermittlung des aversiven Salzgeschmacks angenommen werden (Oka, Butnaru *et al.* 2013), sodass zumindest ein Teil der Typ III-Zellen auch an dieser Geschmacks-Detektion beteiligt zu sein scheint.

Wie noch in 1.2.2.5 und 1.2.2.6 erläutert wird, ist ein besonderes Merkmal von Typ III-Zellen, dass sie Signale von Typ II-Zellen empfangen und weitergeben können. Demzufolge sind sie, im Gegensatz zu Geschmacksrezeptorzellen, nicht nur auf spezielle Geschmacksqualitäten ausgerichtet, sondern können, zum Teil indirekt, auf süß, umami, salzig, sauer und bitter schmeckende Substanzen reagieren (Tomchik, Berg *et al.* 2007). Werden allerdings *Pkd2L1* (*Polycystic kidney disease 2-like 1*) exprimierende Typ III-Zellen, die offensichtlich mehr als 90% aller Typ III-Zellen ausmachen (Kataoka, Yang *et al.* 2008), in Mäusen genetisch zerstört, hat dies ausschließlich Einfluss auf die Aktivierung ihrer Geschmacksnerven durch Säuren. Unbeeinflusst bleiben jedoch die Reaktionen solcher Mäuse gegenüber Geschmacksstimuli aller anderen Qualitäten (Huang, Chen *et al.* 2006). So scheint die Rolle von Typ III-Zellen in der Süß-, Umami-, Salz- oder Bittergeschmacks-Signalübertragung nicht obligatorisch und bleibt weiterhin zu untersuchen. Insgesamt scheinen die Typ III-Zellen hinsichtlich ihrer Expression oder Funktion jedoch auch keine vollständig homogene Population zu sein (Yee, Yang *et al.* 2001; Tomchik, Berg *et al.* 2007; Chaudhari und Roper 2010).

Die Überlebensdauer von Typ III-Zellen ist wesentlich höher, als die der Typ II-Zellen, ihre Halbwertszeit beträgt 22 Tage (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013).

1.2.2.4 Basalzellen (oder Typ IV-Zellen)

„Basalzellen“ beschreibt eine Kategorie von kugel- oder eiförmigen Zellen, die keine Ausdehnungen bis in die Öffnung der Geschmacksknospe aufweisen und vermutlich undifferenzierte oder unreife Geschmackszellen darstellen (Chaudhari und Roper 2010). Es wurde bereits gezeigt, dass in diesen Zellen diverse Transkriptionsfaktoren und Signalmoleküle, wie z. B. *sonic hedgehog* (Shh), exprimiert werden, welche die Zellentwicklung beeinflussen (Miura, Kusakabe *et al.* 2001; Miura, Kusakabe *et al.* 2006). Es scheint außerdem, dass Basalzellen keine homogene Klasse darstellen, denn 60–80% dieser Population haben eine mittlere Lebensdauer von acht Tagen, wohingegen 20–40% im Durchschnitt 24 Tage lang überleben (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013). Tatsächlich untermauert eine aktuelle Studie die Funktion der Basalzellen als post-mitotische Vorläuferzellen aller anderen Geschmacks-Zelltypen (Miura, Scott *et al.* 2014).

1.2.2.5 Signalübertragungsmechanismen der Typ II-Zellen (Geschmacksrezeptorzellen)

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren für süß, umami und bitter nutzen heterotrimere GTP-bindende Proteine zur Signalübertragung. Die G-Protein- α -Untereinheit, α -Gustducin, spielt dabei für die Übertragung von Süß-, Bitter- und Umamigeschmack, jedoch nicht für den Sauer- oder Salzgeschmack, eine Rolle (Wong, Gannon *et al.* 1996; Ruiz, Wray *et al.* 2003; Danilova, Damak *et al.* 2006; Roper 2007). Zuerst wurde α -Gustducin in Geschmackszellen von Ratten nachgewiesen (McLaughlin, McKinnon *et al.* 1992). Dass sowohl die Bitter-, als auch die Süßgeschmacksübertragung vorwiegend α -Gustducin-abhängig ist, konnte anhand von α -Gustducin-*Knock-out*-Mäusen, deren Süß- bzw. Bittergeschmackswahrnehmung dramatisch reduziert war, demonstriert werden (Wong, Gannon *et al.* 1996; Danilova, Damak *et al.* 2006). Später wurde dessen Rolle ebenso in der Umamigeschmacksübertragung bestätigt (Ruiz, Wray *et al.* 2003). Die direkte Aktivierung von α -Gustducin durch einen heterolog exprimierten Maus-Bitterrezeptor, mT2R5, konnte in Insekten-Zellen gezeigt werden (Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000). Es ist wahrscheinlich, dass die Funktion von α -Gustducin nach der Aktivierung von Bitterrezeptoren auch durch andere G-Protein- α -Untereinheiten ergänzt wird (Wong, Ruiz-Avila *et al.* 1999). Zum Beispiel gibt es ein Sehstäbchen-Transducin, welches in Geschmacksgewebe von Ratten gefunden wurde und vermutlich auch in der Bittergeschmacksübertragung agieren kann (Ruiz-Avila, McLaughlin *et al.* 1995). Süß- und Umamigeschmacksrezeptoren könnten aber auch an $G\alpha_{14}$ oder andere $G\alpha$ -Untereinheiten binden (Tizzano, Dvoryanchikov *et al.* 2008). Nach der Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins, aktivieren die $\beta\gamma$ -Untereinheiten Phospholipase β_2 (PLC β_2) (Huang, Shanker *et al.* 1999; Rossler, Boehhoff *et al.* 2000; Yan, Sunavala *et al.* 2001). Dabei spielen vermutlich $G\beta_3$ und $G\gamma_{13}$ für die Bitter-Signalübertragung eine vorwiegende Rolle (Huang, Shanker *et al.* 1999; Rossler, Boehhoff *et al.* 2000). Nach der Aktivierung von PLC β_2 , welche die Synthese von Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP $_3$) stimuliert, bindet IP $_3$ an den Typ 3 IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R3) im endoplasmatischen Retikulum, was zu einem Calciumionen-Einstrom ins Zytosol der Geschmacksrezeptorzellen führt (Ogura, Mackay-Sim *et al.* 1997; Rossler, Kroner *et al.* 1998; Clapp, Stone *et al.* 2001).

Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zur Öffnung des nicht-selektiven *transient receptor potential channel subfamily M member 5* (TRPM5) (Perez, Huang *et al.* 2002; Hofmann, Chubanov *et al.* 2003; Liu und Liman 2003; Perez, Margolskee *et al.* 2003; Prawitt, Monteilh-Zoller *et al.* 2003), was wiederum einen Einstrom von Natriumionen und Membran-Depolarisation der Typ 2-Zellen zur Folge hat. Die hohen Calcium-Spiegel und die depolarisierte Membran führen danach zur Öffnung von Halbkanälen von *Gap Junctions* und zur Freisetzung von ATP in den extrazellulären Raum (Huang, Maruyama *et al.* 2007; Romanov, Rogachevskaja *et al.* 2007). ATP ist dann in der Lage an homo- oder heteromere ionotrope purinerge Rezeptoren (P2X₂/P2X₃) in afferenten Geschmacksnerven zu binden (Finger, Danilova *et al.* 2005). Dabei ist allerdings noch unklar, wie unterschieden wird, ob das ATP von einer Süß-, Umami- oder Bitterzelle stammt. Überdies kann ATP auch eine positive Rückkopplung an Typ 2-Zellen bewirken, welche metabotrope purinerge Rezeptoren, P2Y₁, exprimieren. Dabei wird ATP durch eine Ecto-ATPase in ADP umgewandelt, welches dann wiederum an P2Y₁-Rezeptoren der Typ 2-Zellen binden kann und die Zellen somit autokrin anregt (Huang, Dando *et al.* 2009). Weiterhin kann ATP auch präsynaptische Typ III-Zellen über deren P2Y-Rezeptoren aktivieren, um dann die Sekretion von Neurotransmittern, wie Serotonin (5-HT) oder Norepinephrin, anzuregen (Huang, Maruyama *et al.* 2008).

1.2.2.6 Weitere interzelluläre Kommunikation in der Geschmacksknospe

Serotonin könnte einerseits afferente Geschmacksnervenfasern anregen, außerdem ist es in der Lage parakrin eine negative Rückkopplung auf Typ II-Zellen auszuüben (Huang, Dando *et al.* 2009; Chaudhari und Roper 2010). Der Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) kann parakrin, durch negative Rückkopplung, die ATP-Sekretion von Typ II-Zellen inhibieren (Dvoryanchikov, Huang *et al.* 2011). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieser Neurotransmitter weitere Funktionen hat, denn er wird nicht nur in Typ III-, sondern auch in Typ I-Zellen synthetisiert. Zusätzlich sind dessen Rezeptoren nicht nur in Typ II-, sondern auch in Typ III-Zellen lokalisiert. Auch für Glutamat konnte bereits eine Wirkung als Neurotransmitter vermutet werden: Es könnte von gustatorischen Nervenfasern ausgeschüttet werden, um Typ III-Zellen, welche spezifische Glutamat-Rezeptoren exprimieren, zu modulieren (Vandenbeuch, Tizzano *et al.* 2010; Huang, Grant *et al.* 2012). Es wird also ersichtlich, dass Geschmacksknospen komplexe Zusammenschlüsse von spezialisierten Zellen sind, die auf zahlreiche Weise miteinander kommunizieren. Viele dieser Regulationsmechanismen bleiben jedoch zunächst noch zu erforschen.

1.2.3 Weiterleitung und Verarbeitung von Geschmacksinformationen

Die Informationen aus den Geschmacksknospen werden über gustatorische Nervenfasern (Geschmacksfasern) zum zentralen Nervensystem weitergeleitet. Drei verschiedene Hirnnerven innervieren die Geschmacksknospen der Mundhöhle: Der VII. (*Nervus facialis*), der IX. (*Nervus glossopharyngeus*) und der X. Hirnnerv (*Nervus vagus*). Der

1 Einleitung

VII. Hirnnerv teilt sich in zwei Äste. Davon übermittelt ein Ast, *Nervus petrosus major* (NPM), Signale ausgehend vom weichen Gaumen, und bei Nagern auch vom NID, zum Gehirn. Ein zweiter Ast des VII. Hirnnervs, die *Chorda tympani* (CT), innerviert die Geschmacksknospen der Pilzpapillen und der vorderen Segmente der Blätterpapillen. Der übrige Teil der Blätterpapillen, sowie die Geschmacksknospen der Wallpapille(n) werden vom IX. Hirnnerv versorgt. Der X. Hirnnerv leitet Informationen der Geschmacksknospen des Kehledeckels und des Rachens weiter. (Überblick in Miller 1995)

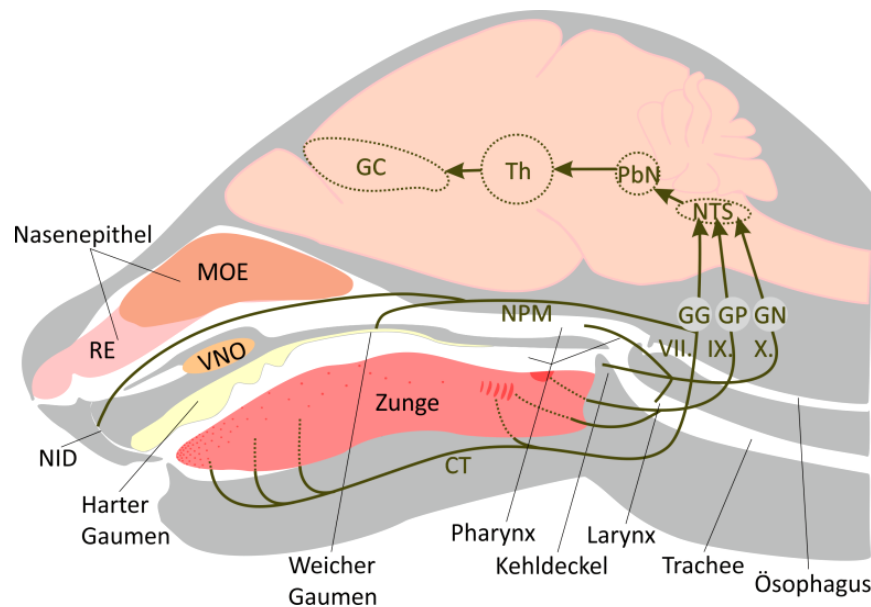


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Weiterleitung der Geschmacksinformationen in Nagern. Geschmacksknospen des Gaumens, NID und der vorderen Zunge werden von den zwei Ästen des *Nervus facialis* (VII. Hirnnerv) innerviert, *Nervus petrosus major* (NPM) und *Chorda tympani* (CT). Deren Zellkörper vereinigen sich im *Ganglion geniculatum* (GG). *Nervus glossopharyngeus* (IX.) innerviert die Papillen der hinteren Zunge.

Deren Zellkörper befinden sich im *Ganglion petrosum* (GP). Geschmacksknospen von Pharynx, Larynx und Kehledeckel werden von einem Ast des *Nervus vagus* (X. Hirnnerv) innerviert, dessen Zellkörper im *Ganglion nodosum* (GN) liegen. Die Stationen der Geschmackverarbeitung im Gehirn sind: *Nucleus tractus solitarii* (NTS) im Hirnstamm, *Nucleus parabrachialis* (PbN), *Thalamus* (Th) und schließlich der gustatorische Cortex (GC).

RE = Respiratorisches Epithel, MOE = Olfaktorisches Epithel (engl. *main olfactory epithelium*), VNO = Vomeronasalorgan

Die Zellkörper der Geschmacksfasern all dieser Nerven sind in sogenannten Ganglien organisiert. So sind Zellkörper der Fasern von CT und NPM des VII. Hirnnervs im *Ganglion geniculatum* (GG) lokalisiert. *Ganglion petrosum* (GP) vereint die Zellkörper von Geschmacksfasern des IX., *Ganglion nodosum* (GN) die des X. Hirnnervs. Von diesen Ganglien aus projizieren die Geschmacksfasern in den Geschmackskern des Hirnstamms, *Nucleus tractus solitarii* (NTS). Dieser bildet die erste Station der Geschmackverarbeitung im Gehirn und spielt z. B. beim angeborenen Nahrungs-Aufnahme- und Ablehnungsverhalten eine Rolle. Von dort aus projizieren Geschmacksnerven auch in höhere Hirnregionen. Dabei ist bei vielen Säugetieren, wie den Nagern, die nächste Region der *Nucleus parabrachialis* (PbN). Beim Menschen wird diese Station übersprungen, und NTS-Neuronen projizieren als nächstes in den *Thalamus* (Th) und dann in gustatorische Areale der Großhirnrinde (GC). Dort werden Geschmacks- mit Tast-, Temperatur-, olfaktorischen und visuellen Reizen integriert. (Überblick in Miller 1995)

Obwohl die Bahnen der Geschmacksverarbeitung und -übertragung anatomisch weitgehend erschlossen sind, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden, wie die Verschlüsselung von Geschmacksinformationen der verschiedenen Qualitäten erfolgt. So werden in der Literatur vor allem zwei verschiedene Hypothesen dazu diskutiert (Smith, John *et al.* 2000). Einerseits könnten fest den spezifischen Geschmacksqualitäten zugeordnete Nervenfasern jede Geschmacksmodalität separat übertragen, sozusagen in „markierten Bahnen“ (*labeled line* -Theorie (Frank 1973; Pfaffmann 1974)). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die unterschiedlichen Qualitäts-Informationen in festen „Mustern“ über die Gesamtheit der Nervenfasern übertragen werden (*across fibre* -*pattern*-Theorie (Pfaffmann 1941)). Eine dritte Möglichkeit der Kodierung, die seltener diskutiert wird, besteht in einer zeitlich regulierten Aktivierung der Geschmacksnerven (Chaudhari und Roper 2010). Bisher war es nicht möglich eine dieser Theorien als alleingültige Regel zur Verschlüsselung der Geschmacksinformationen zu bestätigen. So könnte es auch sein, dass zur Geschmacks-Kodierung diese diskutierten Möglichkeiten kombiniert werden.

1.3 Geschmacksqualität – bitter und ihre Rezeptoren

In erster Linie wird die Geschmacksqualität bitter mit negativem Empfinden assoziiert, und man glaubt, dass ein bitterer Geschmack den Organismus davor schützt, gefährliche oder auch giftige Stoffe oder Nahrungsmittel aufzunehmen (Lindemann 1996). Tatsächlich löst Bittergeschmack bei Säugern angeborene Abwehrmechanismen aus (Steiner 1973; Grill und Norgren 1978; Steiner, Glaser *et al.* 2001). Er kann aber auch zum Genuss von Lebensmitteln beitragen, ist oft bei erwachsenen Menschen sogar erwünscht (Meyerhof 2005).

1.3.1 Bitterstoffe

Substanzen, die einen bitteren Geschmack besitzen, werden als Bitterstoffe bezeichnet, von denen hunderte, wenn nicht sogar tausende in der Natur und damit potentiell in der Nahrung von Säugetieren vorkommen (Behrens und Meyerhof 2011; Wiener, Shudler *et al.* 2012). Die – meist für den Menschen – identifizierten Bitterstoffe sind strukturell sehr verschieden, können beispielsweise in Größe, Ladung und ihren hydrophoben Eigenschaften stark variieren (Meyerhof, Behrens *et al.* 2005). Außerdem können sie unterschiedlichsten chemischen Stoffklassen zugeordnet werden. Dazu gehören natürliche Stoffe, wie Alkaloide (z. B. Chinin oder Papaverin), Aminosäuren, Antibiotika (z. B. Cycloheximid), β -Glucoside (z. B. Arbutin), Peptide, Phenole, Steroide (z. B. Cucurbitacin I), oder Salzionen (z. B. bei Natriumbenzoat). Aber auch synthetische Substanzen, wie Ammoniumverbindungen (z. B. Denatoniumbenzoat), Thioharnstoff-Derivate (z. B. 6-*n*-Propylthiouracil [PROP]) oder auch künstliche Süßstoffe (z. B. Acesulfam K) zählen dazu (Meyerhof 2005; Meyerhof, Batram *et al.* 2010; Meyerhof, Born *et al.* 2011 und darin enthaltene Quellenangaben). Viele der Bitterstoffe, wie z. B. die meist toxischen Alkaloide, stammen aus Pflanzen (Barratt-Fornell und Drewnowski 2002). Es wird

vermutet, dass sie die Pflanze vor Insektenfraß oder -befall sowie vor Bakterien- oder Pilzbefall schützen. Aber bei weitem nicht alle der Pflanzen-Bitterstoffe (Bsp. Carotenoide, Limonoide) sind für Menschen bzw. Säugetiere hochgiftig, sie können in niedrigeren Konzentrationen durchaus gesundheitsfördernde oder antiseptische Eigenschaften aufweisen (Barratt-Fornell und Drewnowski 2002). Durch den Verzehr von Gemüse werden sie teilweise bereitwillig aufgenommen, führen aber auch manchmal – gerade wegen ihrer Bitterkeit – zur Ablehnung dieser Nahrungsmittel. Viele Bitterstoffe werden außerdem in Medikamenten eingesetzt, wie z. B. Chinin, welches aus der Chinabaumrinde gewonnen wird und in manchen Ländern als Malaria-Medikament, in anderen als krampflösendes Mittel Anwendung findet (Europäisches Arzneibuch; El-Tawil, Al Musa *et al.* 2010; Achan, Talisuna *et al.* 2011). Auch viele Antibiotika, wie Erythromycin, schmecken bitter (Uchida, Tanigake *et al.* 2003; Meyerhof, Batram *et al.* 2010). Da häufig Arzneimittel aufgrund ihres Bittergeschmacks, gerade von Kindern, abgelehnt werden, ist es daher besonders für die Industrie interessant, wie Bitterstoffe genau erkannt werden und eventuell deren unerwünschter Geschmack maskiert werden kann.

Genussmittel können ebenfalls Bitterstoffe enthalten, wie die im Käse bei der Fermentierung entstehenden Peptide (Behnke und Schalinatus 1975), oder im Bier – die Umlagerungsprodukte der α -Humulone aus dem Hopfen (*Humulus lupulus*), die beim Erhitzen der Stammwürze entstehen [*cis*- und *trans*-Iso- α -Säuren, auch Isohumulone genannt; (Intelmann, Batram *et al.* 2009; Urban, Dahlberg *et al.* 2013)]. Solche Bittersubstanzen wiederum können maßgeblich zum charakteristischen Wohlgeschmack eines Nahrungsmittels beitragen.

An den genannten Beispielen wird deutlich, dass es eine heterogene Vielfalt von Bitterstoffen gibt, die es zu erkennen und zu beurteilen gilt. Nicht nur für uns Menschen wäre es daher vorteilhaft die Fähigkeit zu besitzen, Bitterstoffe zu unterscheiden. Für Tiere, deren Nahrung potentiell giftige Substanzen enthält, könnte es einen evolutionären Vorteil darstellen, schädliche und unschädliche Bitterstoffe auseinanderhalten zu können und somit z. B. einerseits Vergiftungen zu vermeiden und andererseits nützliche Stoffe mit ihrer Nahrung aufzunehmen (Bsp. Huffman 2003). Um dieser Frage auf den Grund zu gehen (siehe 1.3.5.2), ist es zunächst notwendig zu verstehen, wie die verschiedenartigen Bitterstoffe erkannt werden. Dies soll in den folgenden Abschnitten (1.3.2, 1.3.3, 1.3.4) genauer erläutert werden.

1.3.2 Bittergeschmacksrezeptoren

Sensoren, die Bitterstoffe detektieren, sind Geschmacksrezeptoren der Typ 2-Gen-Familie, die sogenannten Bittergeschmacksrezeptoren (Tas2r/TAS2R, siehe 1.2.2.2).

Innerhalb aller Vertebraten variiert die Anzahl dieser Rezeptoren enorm. So besitzen Frösche (*Xenopus tropicalis*) beispielsweise 51 funktionelle Bitterrezeptoren (Li und Zhang 2013). Hühner (*Gallus gallus*) oder Stichlinge (*Gasterosteus aculeatus*) hingegen weisen nur drei funktionelle Bitterrezeptorsequenzen auf. Eine neuere Analyse von Tas2r-Sequenzen, die marine Säugetiere einschließt, offenbart, dass auch innerhalb der Säuger-Klasse eine enorme Varianz in der Bitterrezeptor-Anzahl existiert (Li und Zhang

2013). Sie zeigt eine mittlere Anzahl von etwa 18 Rezeptoren. Mäuse besitzen beispielsweise 35 funktionelle Bitterrezeptoren (Go, Satta *et al.* 2005; Shi und Zhang 2006; Li und Zhang 2013). Beim Menschen wurden bislang rund 25 TAS2R-Sequenzen, die für funktionelle Rezeptoren kodieren, gefunden (Behrens und Meyerhof 2013). Der Delphin (*Tursiops truncatus*) stellt offensichtlich einen Sonderfall dar. Bei ihm konnten überhaupt keine funktionellen, sondern nur noch zehn Pseudogen-Tas2r-Sequenzen identifiziert werden (Li und Zhang 2013). Auch besitzt er keine funktionellen Umami- und Süßrezeptoren (Jiang, Josue *et al.* 2012). So könnte der Delphin, da er als reiner Fisch- bzw. Kalmarfresser seine Nahrung in einem Stück verschlingt, überhaupt keine Geschmacksrezeptoren benötigen. Allgemein wird vermutet, dass sich die Anzahl der Bittergeschmacksrezeptoren der unterschiedlichen Spezies evolutionär an deren Nahrungsspektrum anpasst. Damit wären Verluste von nicht benötigten Geschmacksrezeptoren erklärbar. Für die Süß- und Umamirezeptoren ist dieses Phänomen bereits gut bekannt. Beispielsweise können, durch Pseudogenisierung des *Tas1r2*-Gens in der Familie der Katzen (*Felidae*), diese Tiere keine süßen Substanzen schmecken (Li, Li *et al.* 2005). Als Karnivoren scheinen sie diese Fähigkeit nicht zu benötigen, was wahrscheinlich zum evolutionären Verlust des funktionellen Süßrezeptors führte. Oder der Große Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) z. B. besitzt als Nahrungsspezialist für Bambus keinen funktionellen Umamirezeptor, der Aminosäuren erkennt (Zhao, Yang *et al.* 2010). Betrachtet man ausschließlich einige terrestrische Säuger, so besitzen Karnivoren eher ein kleineres Bittergeschmacksrezeptor-Repertoire als Herbivoren (Hu und Shi 2013). Dies könnte auf eine vermehrte Existenz von Bitterstoffen in der Pflanzen-Nahrung zurückzuführen sein. Im Allgemeinen erscheint es allerdings schwierig, zutreffende Vorhersagen über die Bitterrezeptor-Anzahl für ganze Tiergruppen zu machen. Vielmehr sollte dafür das spezifische Nahrungsspektrum jeder Spezies separat betrachtet werden.

1.3.3 Bitterstoff-Detektion und Rezeptor-Interaktion bei Säugern

Seit der Entdeckung von Bittergeschmacksrezeptoren Ende des 20. Jahrhunderts (Adler, Hoon *et al.* 2000; Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000; Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000), richteten sich Analysen zu ihrer Charakterisierung hauptsächlich auf Nager und vor allem auf den Menschen. Besonders interessierte die Frage, wie all die zahlreichen, strukturell sehr unterschiedlichen Bitterstoffe (1.3.1) von einer vergleichsweise geringen Anzahl an Rezeptoren (1.3.2) detektiert werden können. Die meisten der Agonisten von Bitterrezeptoren, d. h. Substanzen, die Bitterrezeptoren aktivieren, wurden in sogenannten *In-vitro*-Studien für humane Rezeptoren identifiziert (z. B. Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000; Bufe, Hofmann *et al.* 2002; Behrens, Brockhoff *et al.* 2004; Kuhn, Bufe *et al.* 2004; Pronin, Tang *et al.* 2004; Sainz, Cavenagh *et al.* 2007; Meyerhof, Batram *et al.* 2010). Dadurch sind bereits für 21 der etwa 25 humanen Bitterrezeptoren Aktivatoren gefunden worden (Meyerhof, Batram *et al.* 2010; Thalman, Behrens *et al.* 2013). Lange Zeit waren jedoch nur für zwei Maus- und einen Ratten-Tas2r Agonisten bekannt (Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000; Bufe, Hofmann *et al.* 2002). Mittlerweile konnten durch Dr. Kristina Loßow aus unserer Arbeitsgruppe etliche weitere Maus-

1 Einleitung

Tas2r-Liganden identifiziert werden, sodass nun auch hier für 18 der 35 Rezeptoren aktivierende Bitterstoffe identifiziert sind (Loßow 2011). Ihre Experimente zeigen, dass orthologe Bittergeschmacksrezeptoren von Maus und Mensch nicht durch die gleichen Bitterstoffe angeregt werden. Auch hier liegt es nahe, dass ein komplett unterschiedliches Ernährungsverhalten von Maus und Mensch dieser Tatsache zugrunde liegt. Für beide Spezies scheinen jedoch zwei wichtige grundlegende Prinzipien zu gelten: (1) Unter den Bittergeschmacksrezeptoren gibt es Spezialisten und Generalisten. D. h., ein TAS2R/Tas2r kann durch einen einzelnen (Spezialist), oder auch durch eine Vielzahl (Generalist), meist jedoch durch eine mittlere Anzahl von Bitterstoffen aktiviert werden. (2) Umgekehrt kann ein Bitterstoff zum Teil mehrere Rezeptoren aktivieren (Meyerhof *et al.*, 2010).

Da ein Rezeptor mehrere Bitterstoffe detektieren kann, scheint somit auch die Erkennung aller Bitterstoffe durch die vorhandenen Bitterrezeptoren erklärbar. Beispielsweise reichen die drei humanen Generalisten aus, um in *In-vitro*-Studien mehr als 50% aller getesteten Bittersubstanzen zu erkennen (Meyerhof, Born *et al.* 2011). Eine Oligomerisierung von Bittergeschmacksrezeptoren könnte theoretisch die Anzahl an detektierten Bitterstoffen noch erhöhen. In der Tat konnte eine Homo- bzw. Heteromerisierung von humanen TAS2R *in vitro* bereits gezeigt werden (Kuhn, Bufe *et al.* 2010). Es konnten jedoch keine funktionellen Konsequenzen aus der Oligomerisierung beobachtet werden.

Insgesamt scheinen Bittergeschmacksrezeptoren als Nah-Sensoren bittere Substanzen innerhalb nahrungsrelevanter Konzentrationen zu detektieren, was dazu dienen könnte, die Aufnahme von sehr giftigen Stoffen zu verhindern, ohne jedoch die Zufuhr von potentiell nahrhaften Lebensmitteln zu limitieren (Behrens und Meyerhof 2013). Beispielsweise aktivieren für den Menschen schon in geringen Konzentrationen hochtoxische Alkaloide, wie Aristolochiasäure (Grollman, Shibutani *et al.* 2007; Shibutani, Dong *et al.* 2007) oder Strychnin, humane TAS2R *in vitro* bereits in nanomolaren Konzentrationen (Kuhn, Bufe *et al.* 2004; Brockhoff, Behrens *et al.* 2007). Hingegen werden z. B. die β -Glucoside D(-)-Salicin (ein natürliches Schmerzmittel) und Arbutin von TAS2R16 erst bei mittleren effektiven Konzentrationen im millimolaren Bereich detektiert (Bufe, Hofmann *et al.* 2002). Beachtet werden sollte bei diesen Betrachtungen jedoch, dass es auch Bitterrezeptor-Antagonisten gibt, die Agonisten in ihrer Wirkung hemmen, ohne selbst eine Aktivierung auszulösen (Slack, Brockhoff *et al.* 2010). Überraschend ist dabei, dass natürliche Bitterstoffe gleichzeitig als Bitter-Agonisten und -Antagonisten wirken können und somit im Zusammenspiel in der Nahrung unterschiedliche Geschmackserlebnisse auslösen könnten (Brockhoff, Behrens *et al.* 2011).

Die Bitterrezeptor-Proteine von Mäusen oder Menschen sind zwischen 291 und 334 Aminosäuren lang (Andres-Barquin und Conte 2004). Im Gegensatz zu Geschmacksrezeptoren der Familie 1 (Tas1r/TAS1R), welche zur Superfamilie C der G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit einer langen N-terminalen Domäne gehören (Hoon, Adler *et al.* 1999), besitzen Bittergeschmacksrezeptoren lediglich einen kurzen extrazellulären N-Terminus (Adler, Hoon *et al.* 2000). Ansonsten weisen sie die typische

heptahelikale Struktur von GPCR auf, wobei sie jedoch keine ähnlichen Merkmale oder konservierte Sequenzen im Vergleich zu bereits etablierten GPCR-Subfamilien zeigen (Meyerhof, Born *et al.* 2011). Somit scheinen sie eher eine eigene Gruppe zu bilden, obwohl sie phylogenetisch eine Verwandtschaft zu den *Frizzled*-Rezeptoren aufweisen (Fredriksson, Lagerstrom *et al.* 2003). Untereinander zeigen Bittergeschmacksrezeptoren höhere Sequenzhomologien, vor allem in den zytosolischen Bereichen und den unteren Transmembran-Regionen (Meyerhof, Born *et al.* 2011).

Alle bisher daraufhin untersuchten humanen Bitterrezeptoren besitzen nur eine Bindungstasche, die in den oberen Transmembran-Regionen lokalisiert ist. Diese bindet über unterschiedliche Aminosäurereste verschiedenartige Agonisten und Antagonisten (Biarnes, Marchiori *et al.* 2010; Brockhoff, Behrens *et al.* 2010; Sakurai, Misaka *et al.* 2010; Born, Levit *et al.* 2013). Ob das für alle Bitterrezeptoren des Menschen und darüber hinaus auch für die *Tas2r* der Maus zutrifft, bleibt jedoch noch zu untersuchen. Eine weitere Voraussetzung für eine Liganden-Interaktion mit einem TAS2R ist, dass diese Substanz in der Lage ist, dessen extrazelluläre Schleifen zu passieren und somit Zugang zur Bindungstasche des Rezeptors zu haben (Pronin, Tang *et al.* 2004; Brockhoff, Behrens *et al.* 2010). Somit könnten auch diese Regionen eine wichtige Rolle für die Rezeptor-Aktivierung spielen.

1.3.4 Bitterrezeptor-Gene von Maus und Mensch

Individuelle Gene kodieren die beschriebenen Bitterrezeptor-Proteine von Maus und Mensch. Eine der bemerkenswertesten Eigenschaften dieser Gene ist, dass ihre kodierenden Sequenzen keine Introns enthalten (Adler, Hoon *et al.* 2000). Eine weitere auffällige Eigenschaft dieser Gen-Familie ist die große Anzahl von Pseudogenen (Andres-Barquin und Conte 2004). Etwa 17% der Maus-*Tas2r* und sogar rund 40% der menschlichen *TAS2R*-Sequenzen sind Pseudogene. Die Bitterrezeptor-Gene bzw. -Pseudogene sind nicht zufällig im Genom verteilt, sondern größtenteils in Clustern angeordnet (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000; Shi, Zhang *et al.* 2003; Andres-Barquin und Conte 2004). Sie sind, sowohl beim Menschen, als auch bei der Maus, auf jeweils drei Chromosomen lokalisiert (Adler, Hoon *et al.* 2000). Alle humanen *TAS2R*-Sequenzen befinden sich auf den Chromosomen 5, 7 und 12. Die *Tas2r*-Gene der Maus sind fast alle auf Chromosom 6 angeordnet (Abbildung 4). Man kann sie dort wiederum in zwei Cluster aufteilen, welche eine Syntenie mit den *TAS2R*-Regionen der humanen Chromosomen 7 und 12 aufweisen (Conte, Ebeling *et al.* 2003; Shi, Zhang *et al.* 2003). Ausnahmen bei der Maus bilden *Tas2r134* und *Tas2r119*, die jeweils auf Chromosom 2 bzw. 15 liegen (Abbildung 4). Phylogenetisch betrachtet existieren zwei Maus-Cluster, die wahrscheinlich in Anpassung an ihr variierendes pflanzliches Nahrungsspektrum, hauptsächlich durch positive Selektion, nach deren Abspaltung von der humanen Linie hervorgegangen sind (Shi, Zhang *et al.* 2003). Sie werden zu den *Tas2r*-Genen der Gruppe A gezählt (Shi, Zhang *et al.* 2003). Alle anderen *Tas2r* (Gruppe B und C) besitzen humane Eins-zu-eins-Orthologe und damit vermutlich auch konservierte Funktionen zwischen Maus und Mensch, und existierten wahrscheinlich schon vor dem Auseinanderlaufen der Prima-

1 Einleitung

ten-Nager-Linie (Shi, Zhang *et al.* 2003). Allgemein lässt das etwa 30% größere Bitterrezeptor-Gen-Repertoire der Maus im Vergleich zum Menschen und dessen größere Diversität darauf schließen, dass Mäuse befähigt sind mehr Bitterstoffe unterschiedlichster chemischer Struktur schmecken zu können (Conte, Ebeling *et al.* 2003). Pseudogene, die wiederum im Menschen zahlreicher vorkommen, könnten evolutionäre Reste von einst intakten, nicht mehr benötigten Genen darstellen (Conte, Ebeling *et al.* 2003; Shi, Zhang *et al.* 2003; Shi und Zhang 2006).

In Abbildung 4 ist die chromosomale Lage aller 35 *Tas2r*-kodierenden Gene der Maus (anhand von C57BL/6-Sequenzen) dargestellt.

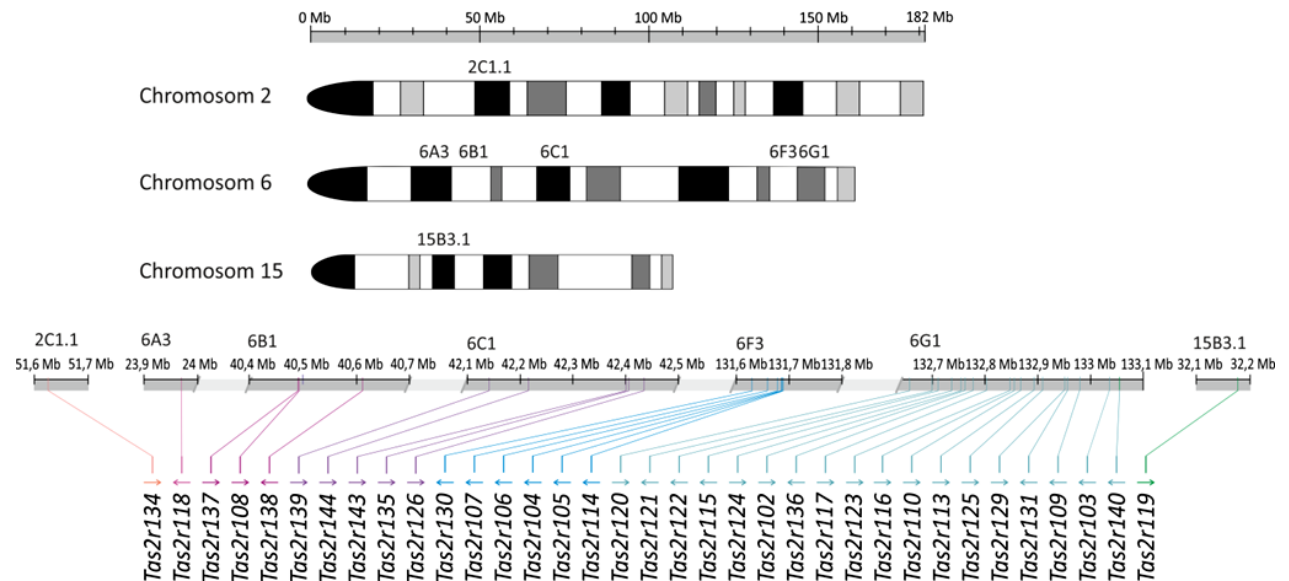


Abbildung 4: Chromosomale Lage aller 35 Maus-*Tas2r*-kodierenden Sequenzen. Dazu wurde die Referenz-Sequenz *GRCm38.p1 C57BL6/J* der NCBI-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt. Die verwendeten Referenz-Sequenz-Annotationen sind für Chromosom 2, NC_000068.7; für Chromosom 6, NC_000072.6; und für Chromosom 15, NC_000081.6. Maus-Chromosomen 2, 6 und 15 sind samt Chromosomenbänden (aus *Idiogram Album: Mouse* copyright © 1994 David Adler) illustriert. Dabei sind die Bänder, innerhalb derer sich Sequenzen der Bitterrezeptor-Gene befinden, benannt und oberhalb der Chromosomen-Darstellungen beschriftet. Darunter sind in 0,1 Megabasen (Mb) aufgeschlüsselt die Teilabschnitte der einzelnen Chromosomen dargestellt, in denen sich die bekannten einzelnen Bitterrezeptor-kodierenden Sequenzen befinden. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung an.

Auch zwischen Bitterrezeptor-Genen innerhalb einer Spezies herrscht große genetische Variabilität. Diese kann sowohl auf Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs), Insertionen, Deletionen, als auch auf Kopienzahl-Veränderungen beruhen (Meyerhof, Born *et al.* 2011). Beispielsweise konnten bereits 2005 im humanen Genom über 100 nicht-synonyme SNPs innerhalb der *TAS2R* identifiziert werden, die zur Ausprägung von 151 verschiedenen Protein-kodierenden Haplotypen führen (Kim, Wooding *et al.* 2005). Diese Gen-Variation kann zu unterschiedlichem Schmecken führen (Kim, Jorgenson *et al.* 2003; Bufe, Breslin *et al.* 2005; Soranzo, Bufe *et al.* 2005; Pronin, Xu *et al.* 2007; Roudnitzky, Bufe *et al.* 2011). Auch für Mäuse sind solche Erscheinungen bekannt. Beispielsweise unterscheiden sich verschiedene Inzucht-Mausstämme in ihrer Geschmacks-Empfindlichkeit gegenüber der Bittersubstanz Sucrose-Octaacetat (Warren

und Lewis 1970). Dies wird durch eine Allel-Variation an einem bestimmten Gen-Ort auf Chromosom 6, dem sogenannten *SOA*-Locus, verursacht (Whitney und Harder 1986; Capeless, Whitney *et al.* 1992). Es gibt weitere Gen-Orte, in einem Cluster distal auf Chromosom 6 gelegen, die Einfluss auf die Empfindlichkeit, verschiedenartige Bitterstoffe, wie Raffinose-Undaacetat (Rua), Cycloheximid (Cyx), Kupfer-Glycinat (Glb) oder Chinin (Qui), zu schmecken, haben (Lush und Holland 1988). Ferner konnte gezeigt werden, dass Mausstämmen, die als *Cyx-Nontaster* gelten, *Missense*-Mutationen im *Tas2r105*-Gen tragen (Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000).

Alles in allem werden sowohl die Unterschiede in der Rezeptorausstattung zwischen Maus und Mensch, sowie die Variationen innerhalb einer Spezies als Anpassung an die Umwelt vermutet. Wahrscheinlich sind diese durch evolutionäre Prozesse und abweichende Selektionsdrücke hervorgerufen wurden.

1.3.5 *Tas2r*-Expression

Dass murine Bitterrezeptoren in Geschmacksknospenzellen exprimiert werden, konnte zuerst mittels *cRNA-in-situ*-Hybridisierung zum Nachweis einiger *Tas2r* demonstriert werden (Adler, Hoon *et al.* 2000; Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000). Dies untermauerte, neben funktionellen Analysen, die tatsächliche Funktion der *Tas2r* als Geschmacksrezeptoren (Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000). Eine dieser ersten Veröffentlichungen über Bittergeschmacksrezeptoren kündigte allerdings schon eine Expression von *Tas2r*-Genen auch außerhalb des gustatorischen Systems an (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000).

1.3.5.1 Extraorale Bitterrezeptoren

Mittels RT-PCR wurde bereits im Jahre 2000 die mRNA einiger *Tas2r* in Maus-Testes nachgewiesen (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000). Nachdem 2007 die Expression von α -Gustducin in Spermatozoen von Maus, Ratte und Mensch gezeigt werden konnte (Fehr, Meyer *et al.* 2007), wurde kürzlich auch die Bitterrezeptor-Expression in Spermien von Mäusen bestätigt (Voigt, Hübner *et al.* 2012; Xu, Cao *et al.* 2013). Ferner konnte gezeigt werden, dass *Tas2r105* in Spermatiden vorkommt und, dass die Ablation von *Tas2r105* exprimierenden Zellen zu kleineren Testes und zum Verlust eines Großteils der Spermatiden führt (Li und Zhou 2012). Maus-Spermatiden und -Spermatozoen reagieren außerdem konzentrationsabhängig, mit einem intrazellulären Calcium-Anstieg auf verschiedene Bittersubstanzen (Xu, Cao *et al.* 2013). Die Rolle der Bitterrezeptoren dabei und die Funktion dieses Mechanismus bleiben jedoch noch zu klären.

Stetig steigt die Zahl der Berichte über extragustatorische Expressionsorte von Geschmacksrezeptoren (Behrens und Meyerhof 2011). Für Bitterrezeptoren findet man dabei hauptsächlich mRNA-Nachweise, die oft entweder das, meist murine, respiratorische System oder den Gastrointestinaltrakt betreffen. Bereits 2003 konnten Finger und Kollegen nicht nur die Expression von geschmacksspezifischen Signalkomponenten, wie α -Gustducin und PLC β 2, in den sogenannten *solitary chemosensory cells* (SCCs) der Nasenhöhle von Nagern nachweisen (Finger, Bottger *et al.* 2003). Sie zeigten außerdem

1 Einleitung

das Vorhandensein einzelner Tas2r-mRNAs (Tas2r108 und Tas2r119, jedoch nicht Tas2r105) in dieser Art von Zellen. In Mäusen erzeugt die Stimulation solcher nasalen SCCs mit Bitterstoffen (Finger, Bottger *et al.* 2003), wie z. B. auch dem Agonisten für Tas2r108, Denatonium (Gulbransen, Clapp *et al.* 2008), oder Geruchsreizstoffen (Lin, Ogura *et al.* 2008) eine Absenkung der Respirationsrate, was als Schutzmechanismus vor Inhalation gefährlicher Substanzen interpretiert wird (Finger, Bottger *et al.* 2003). Jedoch konnte bisher keine direkte Interaktion dieser Substanzen mit Bitterrezeptoren der SCCs gezeigt werden, sodass ein Beweis für deren Funktionalität für den gezeigten Effekt noch zu führen ist. Dasselbe gilt für Experimente, die zeigen, dass Acyl-Homoserinlactone, die auch von Bakterien als *Quorum-sensing*-Moleküle genutzt werden, Maus-SCCs stimulieren und über Bittergeschmacks-Signalkomponenten zu Veränderungen der Respirationsrate dieser Mäuse führen können (Tizzano, Gulbransen *et al.* 2010). Indessen konnte die mRNA-Expression verschiedener Bittergeschmacksrezeptoren im gesamten Atmungssystem, d. h. im Respiratorischen Epithel, Larynx, Trachea, bis hin zur Lunge, in Ratten nachgewiesen werden (Tizzano, Cristofolletti *et al.* 2011). Auch gibt es Hinweise, dass isolierte Maus-Luftröhren-Muskelzellen nach Stimulation mit Bitterstoffen entspannt werden, was sich *in vivo* als Bronchodilatation darstellt, und dass dieser Mechanismus über Komponenten der Bittergeschmacks-Kaskade vermittelt wird (Deshpande, Wang *et al.* 2010; Zhang, Lifshitz *et al.* 2013). Doch auch hier bleibt, trotz Aufzeigen einer Expression des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r107 (Zhang, Lifshitz *et al.* 2013) in diesen Zellen, der unumstößliche Beweis, dass die Reaktion auch über Bittergeschmacksrezeptoren vermittelt wird, noch zu führen.

Für den Gastrointestinaltrakt existieren größtenteils RT-PCR-Nachweise, die Bitterrezeptor-Expression in humanem oder murinem gastrointestinalen Gewebe oder auch in enteroendokrinen Zelllinien zeigen (Wu, Rozengurt *et al.* 2002; Wu, Chen *et al.* 2005; Chen, Wu *et al.* 2006; Rozengurt, Wu *et al.* 2006; Dotson, Zhang *et al.* 2008). Diese Studien offenbaren jedoch nicht, in welchem Zelltypen diese mRNA-Transkripte vorliegen. Bis vor kurzem gab es nur eine einzige Arbeit, die einen Bittergeschmacksrezeptor (Tas2r138) *in situ* mit dem enteroendokrinen Zellmarker Chromogranin A ko-lokalisiert im Dünndarm von Mäusen zeigen konnte (Jeon, Zhu *et al.* 2008). Nun ermöglichte die Nutzung einer in unserem Labor generierten Tas2r131-Reporter-Mauslinie (Tas2r131^{BLiC}/R26^{tdRFP}), die Expression des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r131 in einer Subpopulation von schleimproduzierenden Becherzellen nachzuweisen (Prandi, Bromke *et al.* 2013). Das Auftreten von Bitterrezeptoren in diesem Zelltyp legt eine Rolle von Tas2r bei Abwehrmechanismen gegen möglicherweise gefährliche Stoffe im Gastrointestinalsystem nahe (Prandi, Bromke *et al.* 2013). Diese Rolle der Tas2r, als Bitterstoff-Detektoren und Initiatoren von diversen Abwehrmechanismen, stellt eine der Funktionen dar, die bisher in der Literatur diskutiert wurden (Rozengurt 2006; Sternini, Anselmi *et al.* 2008; Green 2012). In der Tat gibt es im Gastrointestinaltrakt viele physiologische Effekte, die durch Bitterrezeptor-Agonisten ausgelöst werden. Zum Beispiel löst die Infusion von Denatonium in den Magen von Ratten Aversion aus und verlangsamt deren Magen-Entleerung (Glendinning, Yiin *et al.* 2008). Auch wurde

beispielsweise impliziert, dass Bitterstoffe zunächst die Nahrungsaufnahme von Mäusen stimulieren und dann deren Magen-Entleerung verlangsamen, und dass dieser Effekt im Maus-Magen über Tas2r durch eine Grehlin-Sekretion vermittelt wird (Janssen, Laermans *et al.* 2011). Oder auch die Beobachtung, dass die Bittersubstanz 6-*n*-Propyl-2-thiouracil eine gesteigerte Anionen-Sekretion im Dickdarmgewebe auslöst, könnte eine Abwehrreaktion gegen gefährlich Stoffe darstellen (Kaji, Karaki *et al.* 2009). Eine weitere mögliche Aufgabe von Bittergeschmacksrezeptoren im Gastrointestinaltrakt könnte die Unterstützung von positiven oder gar heilsamen Wirkungen von Bittersubstanzen sein. Zum Beispiel scheinen Bitterrezeptor-Haplotypen mit Unterschieden in der Glucose- und Insulin-Homöostase assoziiert zu sein (Dotson, Zhang *et al.* 2008). Eine vermutliche Regulation der GLP-1-Sekretion durch entsprechende Bitterstoffe lässt auf die Regulation der Insulin-Sekretion schließen. Alles in allem ist es unumstritten, dass Bitterstoffe im Magen-Darm-Trakt zahlreiche Reaktionen auslösen können, die entweder der Abwehr gegen diese oft toxischen Stoffe dienen oder positive Effekte auslösen. Die genaue Rolle der Bittergeschmacksrezeptoren in diesem Zusammenspiel ist oft noch zu klären. Denn nicht immer hängen beobachtete Reaktionen auf Bitterstoffe mit einer Vermittlung über Bittergeschmacksrezeptoren zusammen (siehe Behrens und Meyerhof 2011). Eine Studie in Mäusen zeigt zum Beispiel, dass der dargestellte positive Effekt von Isohumulonen auf deren Insulin-Empfindlichkeit Tas2r-unabhängig vermittelt wird (Yajima, Ikeshima *et al.* 2004). Eine Zusammenfassung über die Rolle von Geschmacksrezeptoren im Magen-Darm-Trakt ist u. a. in dem Übersichtsartikel von Behrens und Meyerhof 2011 zu finden.

Eine neuere Studie zeigte, dass Bitterrezeptoren scheinbar auch im Herzen exprimiert werden (Foster, Porrello *et al.* 2013). Mittels quantitativer RT-PCR konnten die Autoren die Expression von sieben Tas2-Rezeptoren (Tas2r108, Tas2r120, Tas2r121, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143) in Herzgewebe von neugeborenen Ratten nachweisen. Mit derselben Methode fanden sie auch Transkripte für mehr als die Hälfte der TAS2R-Familie in humanen Proben des linken Herzventrikels. Die Expression der Ratten-Tas2r scheint dabei vor allem in Herzmuskelzellen, aber auch in Fibroblasten aufzutreten, wie Experimente mit isolierten, kultivierten Zellen dieser Typen zeigten. Bei Glucose-Mangel wiesen die kultivierten Herzmuskelzellen eine erhöhte Tas2r-Expression auf. Auch in Herzgewebe von Mäusen, die man zuvor 48 Stunden hungern ließ, waren Tas2r-Expressionslevel höher als in gefütterten Mäusen. Dies ließ die Autoren der Studie auf eine potentielle Funktion der Bitterrezeptoren als Sensoren für mit der Nahrung aufgenommene Stoffe im Herzen schließen (Foster, Porrello *et al.* 2013).

Überdies konnte in Ratten-Hirngewebe bereits die Expression einiger Bitterrezeptoren detektiert werden (Singh, Vrontakis *et al.* 2011; Dehkordi, Rose *et al.* 2012). Auch in Mäusen scheint neuronale Tas2r-Expression aufzutreten, wie aktuelle Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen (unveröffentlicht). Die Bedeutung der neuronalen Tas2r-Expression wird zurzeit von Dr. Anja Voigt und Antje Stolzenburg der Abteilung Molekulare Genetik (MOGE) des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE) untersucht.

1.3.5.2 Orale Bitterrezeptoren und Konditionen für ein Bitterstoff-Unterscheidungsvermögen

Die Expression von murinen Bitterrezeptoren in Geschmacksknospenzellen von Wall- und Blätterpapillen, dem palatalen Geschmacksstreifen und der Epiglottis konnte zuerst mittels cRNA-*in-situ*-Hybridisierung demonstriert werden (Adler, Hoon *et al.* 2000; Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000). Dabei postulierten die Autoren (Adler, Hoon *et al.* 2000), dass in all diesen Papillen-Arten rund 15% der Zellen Bitterrezeptoren exprimieren. In Pilzpapillen stellten sie jedoch ein geringeres Vorhandensein von Tas2r exprimierenden Zellen von weniger als 10% fest, wobei die wenigen Bitterrezeptor exprimierenden Geschmacksknospen dort für alle untersuchten Tas2r-mRNAs positiv waren. So schlussfolgerten sie, dass alle Bitterrezeptoren zwar in der vorderen Zunge exprimiert werden, jedoch in einem geringeren Teil der dort vorhandenen Geschmacksknospen. Allgemein wird vermutet, dass Bitterrezeptoren innerhalb der Zunge topografisch häufiger in Geschmacksknospen der Blätter- und Wallpapillen, als in Knospen der Pilzpapillen zu finden sind. Für den Menschen konnte bereits die Expression aller 25 funktionellen TAS2R-Gene in Wallpapillen-Zellen gezeigt werden (Behrens, Foerster *et al.* 2007). Obwohl es hinsichtlich der zahlreichen extragustatorischen Expressionsorte wichtiger denn je scheint, wurde allerdings noch nicht gezeigt, ob alle 35 murinen als funktionell charakterisierten Tas2r wirklich in oralen Geschmackspapillen exprimiert werden und damit deren Rolle als Geschmacksrezeptoren besteht.

Innerhalb der Geschmacksknospen der Mundhöhle werden die Bitterrezeptoren ausschließlich in einer Subpopulation von Typ II-Zellen, den Bittergeschmacksrezeptorzellen, exprimiert. Außerdem konnte die Gruppe von Adler und Kollegen 2000 die Tas2r-Expression von Ratten selektiv nur in ebenfalls α -Gustducin exprimierenden Zellen demonstrieren. Bis heute lässt sich sagen, dass Bitterrezeptoren in anderen als in Tas1r exprimierenden Zellen vorkommen, was auf eine Tas2r-Expression unabhängig von G-Protein-gekoppelten Geschmacksrezeptor-Genen anderer Qualitäten schließen lässt. Separat vom Süß- und Umamigeschmack sind diese Zellen also lediglich für die Detektion des Bittergeschmacks verantwortlich (Zhang, Hoon *et al.* 2003; Mueller, Hoon *et al.* 2005; Tomchik, Berg *et al.* 2007) und eventuell teilweise für den aversiven Salzgeschmack [(Oka, Butnaru *et al.* 2013), siehe auch 1.2.2.2, Seite 5]. Schließlich werden verschiedene Geschmacksqualitäten (süß, bitter, umami und salzig) dann auch in separaten kortikalen Bereichen im primären Geschmackszentrum der Großhirnrinde repräsentiert – gewissermaßen in einer bestimmten räumlich geordneten „Geschmackskarte“ – wie in Mäusen gezeigt wurde (Chen, Gabitto *et al.* 2011).

Es wurde bereits erörtert, dass das Vermögen, zwischen Bitterstoffen unterscheiden zu können, einen Vorteil darstellen könnte (siehe 1.3.1). Dass Säugetiere eine solche Fähigkeit tatsächlich besitzen, ist jedoch nicht offensichtlich. Schwierig stellt sich außerdem eine Untersuchung dieser Befähigung dar, denn purer Bittergeschmack löst meist Aversionen aus, Verhaltensweisen, die kaum unterscheidbar sind. Darüber hinaus ist es nicht ratsam, toxische Bitterstoffe zu verkosten. Somit ist es auch für den Menschen schwierig zu beantworten, ob dieser wirklich in der Lage ist, wohlmöglich z. B. bekömmliche von

giftigen Bitterstoffen unterscheiden zu können. Eine Bitterstoff-Unterscheidung wäre denkbar, wenn zunächst die Grundvoraussetzung erfüllt wäre, dass Bitterrezeptoren in Subpopulationen von verschiedenen Bittergeschmacksrezeptorzellen exprimiert würden. So könnten Bitterrezeptoren selektiv auf verschiedene Zellen aufgeteilt werden. Dadurch wären unterschiedliche Zellen befähigt verschiedene Bitterstoffe zu detektieren und damit zunächst separat z. B. einen gesundheitsfördernden und einen toxischen Bitterstoff auseinanderzuhalten.

Dass eine solche Aufteilung existiert, widerspricht der Auffassung einiger Forscher (Adler, Hoon *et al.* 2000; Mueller, Hoon *et al.* 2005). So ergab z. B. die Analyse mit sowohl einzelnen als auch mehreren vermengten Tas2r-RNA-Sonden, dass jede murine Bitterrezeptor exprimierende Zelle mehrere Tas2r-mRNA-Sequenzen aufweist. Aus ihren Experimenten schlussfolgerten die Autoren dieser Studie (Adler, Hoon *et al.* 2000), dass jede Bittergeschmacksrezeptorzelle die komplette Anzahl von Tas2-Rezeptoren exprimiert und schlossen außerdem auf eine „limitierte funktionelle Diskriminierung zwischen Tas2r-positiven Zellen“. Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass in Mäusen unterschiedliche Bittergeschmacksrezeptorzellen, gemäß ihrer Tas2r-Expression, existieren (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000). In Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) konnte eine neuere Studie demonstrieren, dass die mRNA von Bittergeschmacksrezeptoren heterogen in überlappenden Geschmacksrezeptor-Zellpopulationen exprimiert werden (Ishimaru, Abe *et al.* 2012). Darüber hinaus konnten frühere Untersuchungen von menschlichen Bittergeschmacksrezeptoren bereits zeigen, dass deren mRNA hoch heterogen verteilt in der Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation nachweisbar ist, was darauf schließen ließ, dass dort eine Bittergeschmacksrezeptorzelle durchschnittlich nur vier bis elf verschiedene *TAS2R*-Gene exprimiert (Behrens, Foerster *et al.* 2007). So scheint die Grundvoraussetzung einer selektiv heterogenen Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation in höheren Säugern (Primaten) bereits bestätigt, ist jedoch in Nagetieren immer noch umstritten (z. B. Yoshida, Miyauchi *et al.* 2009; Ishimaru, Abe *et al.* 2012).

Funktionell konnte allerdings bereits demonstriert werden, dass murine Bittergeschmacksrezeptorzellen einigermaßen selektiv auf bestimmte Bitterstoffe reagieren (Caicedo und Roper 2001). Dies gilt zumindest für die fünf Stoffe: Cycloheximid, Chininhydrochlorid, Denatoniumbenzoat, Phenylthiocarbamid (PTC) und Sucroseoctaacetat (SOA). In ihren Experimenten analysierten Caicedo und Roper (2001) intrazelluläre Calcium-Reaktionen in Geschmacksrezeptorzellen von Ratten, *in situ*. Von 69 untersuchten bitter-empfindlichen Zellen, reagierten 67% nur auf einen der fünf gebotenen Bitterstoffe, 26% nur auf zwei von fünf. Das heißt, auf Seiten der Bittergeschmacksrezeptorzellen bestünde die Voraussetzung für eine Unterscheidung verschiedener Bitterstoffe.

Weiterhin gibt es etliche Studien über distinguierende Fähigkeiten von Säugetieren gegenüber unterschiedlichen Bitterstoffen auf neuronaler Ebene. Es konnte beispielsweise durch Einzel-Neuronen-Ableitungen in Ratten gezeigt werden, dass Geschmacksneuronen erster Ordnung (IX. Hirnnerv und CT) in der Lage sind zwischen Bittersubstanzen zu unterscheiden (Dahl, Erickson *et al.* 1997). Und, obwohl in Ratten

eine hoch korrelative Neuronen-Aktivität in Antwort auf bestimmte Bitter-Stimuli gezeigt werden konnte (Lemon und Smith 2005), gibt es auch Neuronen im Hirnstamm (NTS und PBN) von Ratten und Mäusen, die heterogen auf verschiedene Bitter-Stimuli reagieren (Geran und Travers 2006; Geran und Travers 2009; Wilson, Boughter *et al.* 2012).

In Geschmacksverhaltenstests jedoch können Ratten Chininhydrochlorid und Denatoniumbenzoat nicht voneinander unterscheiden (Spector und Kopka 2002). Die Experimente, die Spector und Kopka (2002) durchführten, orientierten sich gezielt an den Ergebnissen von Caicedo und Roper (2001), die zuvor herausgefunden hatten, dass 29 untersuchte Zellen entweder auf Chininhydrochlorid oder auf Denatoniumbenzoat reagieren, allerdings nur zwei gefundene Zellen auf beide Bitterstoffe ansprechen. Dies spiegelte sich jedoch nicht im Verhalten der Ratten wider. Andere Verhaltenstests zeigen zwar, dass es z. B. in Hamstern zwei Klassen von Bitterstoffen zu geben scheint (ionische gegenüber nichtionischen), die unabhängig voneinander erkannt werden (Frank, Bouverat *et al.* 2004; Hettinger, Formaker *et al.* 2007), oder dass ausgewählte Bittersubstanzen von Menschen unterschiedlich bewertet werden (Delwiche, Buletic *et al.* 2001), aber ein eindeutig distinktives Bittergeschmacks-Verhalten konnte in Säugern bisher nicht gezeigt werden (Spector und Kopka 2002; Mueller, Hoon *et al.* 2005).

1.4 Zielstellung der Arbeit

Die Bittergeschmackswahrnehmung dient Säugern vermutlich in erster Linie zur Detektion von toxischen Substanzen und zur Vermeidung ihrer Aufnahme. Bitterstoffe können dennoch auch bekömmlich oder gar gesundheitsfördernd sein. So könnte die Fähigkeit diese zu unterscheiden einen Vorteil darstellen. Dass eine solche Befähigung bei Säugern existiert, ist jedoch nicht offensichtlich und die Untersuchung dieser stellt sich oft als schwierig heraus. Vor über einem Jahrzehnt wurden die Sensoren zur Erkennung der Bitterstoffe entdeckt (Tas2r [murin] oder TAS2R [human]). Seither stellt die Maus einen interessanten Modellorganismus zur Erforschung der molekularen Grundlagen der Bittergeschmackswahrnehmung in Säugern dar. Einerseits weist sie Ähnlichkeiten zum Menschen auf, z. B. darin, dass sie mehrere funktionelle Bittergeschmacksrezeptoren besitzt. Andererseits scheint sich das Bitterstoff-Erkennungsspektrum der Maus-Tas2r, welches – im Gegensatz zu ihren menschlichen Gegenstücken – erst im Beginn dessen Aufklärung ist, vom humanen TAS2R-Ligandenspektrum zu unterscheiden. Daran können z. B. evolutionäre Anpassungen an speziesspezifische Nahrung erforscht werden. Auch gibt es immer noch viele offene Fragen bezüglich der molekularen Grundlagen der Bittergeschmackswahrnehmung der Maus, vor allem hinsichtlich der Tas2r-Expression: Kodieren tatsächlich alle 35 als funktionell beschriebenen Tas2r-Gene Geschmacksrezeptoren, oder muss man angesichts ihrer zahlreichen extraoralen Expressionsorte davon ausgehen, dass nicht alle Tas2r eine gustatorische Rolle erfüllen? Werden wirklich alle Tas2r in jeder Bittergeschmacksrezeptorzelle ko-exprimiert, oder existiert eine zelluläre Heterogenität, die die Basis für ein Unterschei-

dungsvermögen zwischen verschiedenen Bitterstoffen darstellen könnte? Unterliegen die in chromosomalen Clustern angeordneten Tas2r-Gene einer gemeinsamen Ausprägung hinsichtlich ihrer Expressionsstärke oder -orte, oder gibt es Unterschiede?

Um diese Fragen zu klären, habe ich zunächst Tas2r-Expressionsorte näher betrachtet. Dazu wurden von Dr. Anja Voigt neu generierte, im Locus des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r131 genetisch veränderte Mausmodelle (Voigt 2011 siehe 2.1.10, Seite 32) charakterisiert. Mit Hilfe der Expression des Fluoreszenzreporterproteins, hrGFP, sollten damit sowohl die orale, als auch die extraorale Verteilung des Bitterrezeptors Tas2r131 in der Maus untersucht und visualisiert, sowie mit anderen Tas2r verglichen werden. Überdies sollten diese Mäuse verwendet werden, um am Beispiel von Tas2r131 herauszufinden, ob Bitterrezeptoren bevorzugt in einem bestimmten Geschmackspapillen-Typ vorkommen (Tas2r131^{BLiG/BLiG}- und Tas2r131^{BLiG/BLiG}/Tas1r1^{BLiR/BLiR}-Mäuse).

Um die gustatorische Expression aller 35 bisher als funktionell beschriebenen Maus-Bittergeschmacksrezeptoren nachzuweisen und so deren Relevanz für die Geschmackswahrnehmung zu bestätigen, habe ich zusätzlich Wall- und Blätterpapillengewebe, sowie Blut und nichtgustatorisches Zungengewebe von C57BL/6-Mäusen untersucht.

Schließlich erfolgte eine Analyse der gustatorischen Bittergeschmacksrezeptor-Gesamtzellpopulation. Besonders interessierte dabei die Frage, ob diese in Subpopulationen unterteilt ist und somit die erste Station der Bittergeschmackswahrnehmung theoretisch dazu befähigt wäre, Bitterstoffe zu unterscheiden. Dazu habe ich die Ko-Expression der Tas2r in zwei Arten von genetisch modifizierten Mäusen untersucht. In Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Tieren sollte die Ko-Expression des Tas2r131-Reporters, hrGFP, mit α -Gustducin und mRNA-Sequenzen anderer Tas2r erkundet werden. In weiteren Mäusen, in denen alle Tas2r131 exprimierenden Zellen zerstört (ablatiert) sind (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}), sollte überprüft werden, ob noch andere Tas2r exprimierende Zellpopulationen existieren. Zusätzlich sollten im Tas2r131^{BLiG}-Modell Stimulations-Studien an isolierten Bitterzellen durchgeführt werden, um auf eine mögliche funktionelle Heterogenität dieser Zellen schließen zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders ausgewiesen, wurden alle Standard-Chemikalien entweder von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, D), von der Firma Merck (Darmstadt, D), von Roche (Mannheim, D), Sigma Aldrich (Taufkirchen, D), oder von VWR (Darmstadt, D) verwendet.

2.1.2 Antisera und Farbstoffe

Tabelle 1. Primäre Antikörper

Epitop	Wirt	Konjugierte Gruppe	Hersteller	Verdünnung	Verwendung
DIG	Schaf	Alkalische Phosphatase (AP) (750 U/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	1 : 750	ISH, Dot-Blot
DIG	Schaf	Peroxidase (POD)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D	1 : 250	ISH
hrGFP	Kaninchen	-	Dr. Sachiko Mitsui und Dr. Yoshihiro Yoshihara, Wako, Japan	1 : 100	ISH
α-Gustducin	Kaninchen	-	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, D	1 : 400	IHC

Tabelle 2. Sekundäre Antikörper

Epitop	Wirt	Konjugierte Gruppe	Hersteller (Vertrieb)	Verdünnung	Verwendung
Kaninchen IgG	Ziege	Alexa-Fluor 546	Molecular Probes® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)	1 : 300	IHC

Tabelle 3. Farbstoffe

Bezeichnung	Hersteller (Vertrieb)	Verdünnung	Verwendung
Alexa Fluor® 633 Phalloidin	Molecular Probes® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)	1,5 : 1000	IHC
TO-PRO®-3 Iodide (642/661)	Molecular Probes® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)	1 : 400	IHC, ISH
Fura-2, AM *cell permanent*	Molecular Probes® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)	1 : 1000	Einzelzell- Calcium-Imaging
Fura Red™, AM *cell permanent*	Molecular Probes® (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D)	1 : 1000	Einzelzell- Calcium-Imaging

2.1.3 Enzyme

Tabelle 4. Enzyme

Bezeichnung	Vertrieb
<i>Advantage 2</i> Polymerase Mix, 50x	Clontech, Heidelberg, D
<i>Dispase II (neutral protease, grade II)</i> (0.99 U/mg Iyo.)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<i>DNase I, Amplification Grade</i> (1 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>DNase I, from bovine pancreas</i> (>2000 U/mg)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Klenow-Fragment (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Kollagenase A (0,25 U/mg Iyo.)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Proteinase K, rekombinant, PCR Grade (44,6 U/mg)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Restriktionsenzym <i>EcoRI</i> (10 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Reverse Transkriptase <i>SuperScript™ II</i> (200 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Reverse Transkriptase <i>SuperScript™ III</i> (200 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ribonuklease A (<i>RNase A</i> ; 40 U/ μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
RNase-Inhibitor <i>RiboLock</i> (40 U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>T3</i> -RNA-Polymerase (20 U/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>T7</i> -RNA-Polymerase (20 U/μl)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

2.1.4 Kits und Gebrauchslösungen

Tabelle 5. Kits und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Vertrieb
<i>DIG-RNA-labeling Mix</i> (10x)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<i>Fluorescein RNA Labeling Mix, 10x conc.</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<i>GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	GE Healthcare, Freiburg, D
<i>HiYield® Small DNA Fragments Extraction Kit</i>	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, D
<i>MessageBOOSTER™ cDNA Synthesis Kit for qPCR</i>	Epicentre Biotechnologies, Madison, USA
<i>NucleoSpin® Plasmid Kit</i>	MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, D
<i>Phire Animal Tissue Direct PCR Kit</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
<i>Rapid DNA Ligation Kit</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<i>Single Cell-to-C_T™ Kit</i>	Ambion Inc, Austin, TX, USA
<i>Stratagene Absolutely RNA Nanoprep Kit</i>	Agilent Technologies Mfg GmbH&Co.KG, Waghäusel-Wiesental, D
<i>SYLGARD® 184 Silicone Elastomer Kit</i>	<i>World Precision Instruments</i> , Berlin, D
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>	Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA
<i>TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>TRIzol® Reagent</i>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
<i>Tyramide Signal Amplification Kit</i>	Perkin-Elmer, Boston, USA
<i>Zero Blunt Topo PCR Cloning Kit</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

2.1.5 Größenstandards

Tabelle 6. Größenstandards

Bezeichnung	Vertrieb
<i>GeneRuler™ DNA Ladder Mix</i> (0,5 µg/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>GeneRuler™ Low Range DNA Ladder, ready-to-use</i> (0,1 µg/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>O'GeneRuler Low Range DNA Ladder, ready-to-use</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>O'GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder, ready-to-use</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
<i>RiboRuler™ RNA Ladder, High Range</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.1.6 Plasmide

Zur späteren Generierung von ISH-Sonden wurden als Matrize in einer PCR Plasmide bestehend aus dem Grundvektor *pcDNA5/FRT* (*Invitrogen GmbH*, Karlsruhe, D) bzw. *pEAK 10* (*Edge Biosystem*, Gaithersburg, USA) verwendet. Durch Einbringung einer Klonierungskassette und einer Punktmutation bei 1831 bp wurden die Plasmide modifiziert (Dr. Bernd Bufe). Die Punktmutation bewirkt einen Verlust der *EcoRI*-Schnittstelle bei 1831 bp und ermöglicht dadurch eine *EcoRI*-Schnittstelle in der *multiple cloning site* als singuläre Schnittstelle zu nutzen. Die Klonierungskassette enthält *sst*- bzw. *hsv*-Sequenzen.

Innerhalb dieser Abschnitte sind Bitterrezeptorsequenzen des C57BL/6-Mausstammes (*National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) enthalten, welche durch Dr. Kristina Loßow kloniert wurden.

Tabelle 7. Plasmide mit Rezeptorsequenzen

klonierte Rezeptorsequenz	Grundvektor
Tas2r102	<i>pEAK 10</i>
Tas2r105	<i>pcDNA5/FRT</i>
Tas2r108	<i>pEAK 10</i>
Tas2r109	<i>pcDNA5/FRT</i>
Tas2r114	<i>pcDNA5/FRT</i>
Tas2r115	<i>pEAK 10</i>
Tas2r118	<i>pEAK 10</i>
Tas2r119	<i>pcDNA5/FRT</i>
Tas2r120	<i>pEAK 10</i>
Tas2r131	<i>pEAK 10</i>
Tas2r138	<i>pcDNA5/FRT</i>
Tas2r140	<i>pEAK 10</i>
Tas2r143	<i>pcDNA5/FRT</i>
Tas2r144	<i>pEAK 10</i>

Außerdem wurde das kommerziell erwerbliche Plasmid *pBluescript II KS+* (*Stratagene*, Amsterdam, NL) genutzt, um verschiedene Sequenzen einzuklonieren und diese Konstrukte anschließend als direkte Matrizen für die *In-vitro*-Transkription einzusetzen.

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Gensequenzen wurden mit Hilfe der Informationen aus den Datenbanken des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und des *Ensembl-Projekts* (<http://www.ensembl.org/>) ermittelt. Alle Primer, sowie die meisten Primer-Sonden-Sets wurden von der Firma *Eurofins MWG Operon* (Ebersberg, D) synthetisiert.

Der Entwurf von Primersequenzen erfolgte mit dem Programm *Vector NTI Suite 9*.

Tabelle 8. Genotypisierungs-Primer

Gen-Nachweis	Interne Primer-Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Produkt-Länge
Cre	P422 cre-for	GCAAGAACCTGATGGACATGTTTCAGG	413 bp
	P423 cre-rev	CAGATTACGTATATCCTGGCAGCGATCG	
DT-A	P332 DT-A-for	AAAGTCGCTCTGAGTTGTAT	350 bp
	P333 DT-A-rev	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	
hrGFP	P102 hrGFP-for	AAGTACCCCGAGGACATCAGCGACTTCTTC	368 bp
	P103 hrGFP-rev	ATGAAGTGGTACTCGGGGAAGTCCTCACC	
mCherry	P100 mCherry-for	GTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACAT	428 bp
	P101 mCherry-rev	TTCTTCTGCATTACGGGGCCGT	
Tas1r1	P104 Tas1r1-for	GAATCCACCTGGTTTCCATCCACGTC	711 bp
	P106B Tas1r1-rev	CTCTCAGGGTGACTTCAGTCTTTAGAGATGG	
Tas2r131	P107A Tas2r131-for	CAAATGCAGTGCATGTTTATGGAATCCA	676 bp
	P108 Tas2r131-rev	GTTCTTGACCCAGTCAGAGCAGTTTGC	

Tabelle 9. Primer für Endpunkt-RT-PCR

Gen-Kurzname	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Genutzte Anlagerungs-Temperatur	Amplikon-Länge
Gustducin	P354 gustducin_fw	GTA CTTCGCAACCACCTCCATTG TTC	66 °C	cDNA: 292 bp gDNA: 4065 bp
	P355 gustducin_rev	GAAGAGCCCACAGTCTTTGAGGTTCTCT		
Plcβ2	P335_Plcβ2_fw	GTCACCAGGAGAAGCTGGAAGAGAGGCA	65 °C	cDNA: 283 bp gDNA: 618 bp
	P336_Plcβ2_rev	AGATGCTGGCATCAGAGGCGGCTCT		
Shh	P356 Shh_fw	GCTGGGATGAGGACGGCCATCATT	66 °C	cDNA: 288 bp gDNA: 3006 bp
	P357 Shh_rev	GGTCTCCGGGACGTAAGTCCTTCAC		
Snap25	P337_Snap25_fw	TAACAAATGATGCCGGGAAAATG	66 °C	cDNA: 317 bp gDNA: 3911 bp
	P338_Snap25_rev	GTGTGTGTGTGTATGTGCAAGACCTACT		
Tas2r102	P239-Tas2r102 forward	ATGGAATCTGTCTTCACAACCTTGC	66 °C	175 bp
	P240-Tas2r102 reverse	TGAGAGTGATTCTTGAAATTGCCAATG		

2 Materialien und Methoden

Gen-Kurzname	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Genutzte Anlagerungs-Temperatur	Amplikon-Länge
Tas2r105	P265-Tas2r105 forward	ATGCTGAGTGCGGCAGAAGGCA	63 °C	294 bp
	P266-Tas2r105 reverse	CCAGACAGTCAGGTGATTCACAGTCA		
Tas2r108	P267-Tas2r108 forward	TGCTCTGGGAACTGTATGTATTTGTGTT	63 °C	274 bp
	P268-Tas2r108 reverse	GCATCCAGAAACTTCCAACACAATAGAA		
Tas2r109	P245-Tas2r109 forward	TGGAGCATCTTTTGAAGAGAACATTTG	60 °C	444 bp
	P246-Tas2r109 reverse	ACAAGAGGACCAGAGACACCAGTAATGT		
Tas2r114	P235-Tas2r114 forward	ATGCTGAGCACAATGGAAGGTGTC	60 °C	302 bp
	P236-Tas2r114 reverse	GTGGCAAACCAGACATTCAATTGAC		
Tas2r115	P241-Tas2r115 forward	TCTTCATTGAAATCTGGGGAATGG	60 °C	215 bp
	P242-Tas2r115 reverse	CCAGGCAGTCTGAATCAGTCTTAATGTA		
Tas2r118	P271-Tas2r118 forward	GTGCCAACGCAAGTCACCATCT	63 °C	392 bp
	P272-Tas2r118 reverse	CCCAGTATCAACCAGAGAACCAGTTTC		
Tas2r119	P273-Tas2r119 forward	GAAGGTCATATGCTCTTCTCCTCCTG	63 °C	362 bp
	P274-Tas2r119 reverse	GATATCCTCATCTTCAGCCACAGAAAGA		
Tas2r120	P237-Tas2r120 forward	CTGTGCCAATGTCTTCATAACCATAGTG	66 °C	287 bp
	P238-Tas2r120 reverse	GACTGTTGGAAAAATTGGCTATCTTGAA		
Tas2r131	P147_Tas2r131_fw	GACTGGAGAATCTATGAAGGGAGAGGATCAG	66 °C	508 bp
	P148_Tas2r131_rev	CTGCTTGAACACTTCTATTTGGGGAG		
Tas2r138	P275-Tas2r138 forward	TCCTGTCTTAACTGTGTCTATGAAGCC	63 °C	409 bp
	P276-Tas2r138 reverse	AAGAAATCTCCTGGAGACCCAGCTT		
Tas2r140	P243-Tas2r140 forward	TAGGGTGTTTAGGAAATGGATTCATAGC	60 °C	336 bp
	P244-Tas2r140 reverse	AAACCACAGTTTTTACCCTCCACCTT		
Tas2r143	P231-Tas2r143 forward	ATGCCCTCCACACCCACATTG	60 °C	251 bp
	P232-Tas2r143 reverse	CAGAGGATGCCAATAAGGTTTCGCT		
Tas2r144	P233-Tas2r144 forward	CAGTCATCTATGGGACTGAATGGGTCAG	66 °C	223 bp
	P234-Tas2r144 reverse	CAAGCAGCAAACCAGAGGTTACAGTAGT		
NTPDase 2	P222 NTPdase-2 fw	TCCAGCTACGCAAATGACCCTTCT	60 °C	cDNA: 293 bp
	P223 NTPdase-2 rev	AAGTTCTCCAGCAGGTAGTTGGCA		
PLCβ2	P224 PLCβ-2 fw	TCCTCGAAGCACATTCTGGACAA	60 °C	cDNA: 331 bp
	P225 PLCβ-2 rev	AGGGTCTCGTGCTTCTGATTGAT		
Snap25	P226 SNAP 25 fw	TGCTGCAGCTGGTTGAAGAGAGTA	60 °C	cDNA: 521 bp
	P227 SNAP 25 rev	ACTTCCCAGCATCTTTGTTGCACG		
β-Aktin	P206_βAktin_fw	TGGGAATGGGTGAGAAGGACTCCTATG	66 °C	cDNA: 441 bp gDNA: 895 bp
	P207_βAktin_rev	TCTTCATGAGGTAGTCTGTCCAGTCCCG		

Tabelle 10. Primer zur Sonden-Generierung

	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
Vorwärts-Primer	P 411 (fw T7- <i>sst</i>)	TAATACGACTCACTATAGGGCTGGCTGTCAGTGGCGAATTC
Rückwärts-Primer	P 412 (rev <i>HSV-T3</i>)	AATTAACCCTCACTAAAGGGTCTTCAGGAGCGAGTTCAGGCT

Alle Primer-Sonden-Sets, die bei der Firma *Eurofins MWG Operon* bestellt wurden, wurden mit dem Programm *Primer Express 3.0* entworfen.

Tabelle 11: Primer-Sonden-Sets (*Gene Expression Assays*) für *Real-Time-PCR* von MWG

Gen-Kurzname	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Amplikon-Länge
Cre	cre-Sonde	FAM-CACCAGCCAGCTATCAACTCGCGC-TAM	63 bp
	TaqMan_cre_fw	TTGCCGCGCCATCTG	
	TaqMan_cre_rev	TTGCTTCAAAAATCCCTTCCA	
Gustducin	Gust-Sonde	FAM-ACAGCCCTGGGTACGTGCCAA-TAM	92 bp
	Gust_fw_TaqMan	CAATGACTCTGCAGCTTACTACCTTAA	
	Gust_rev_TaqMan	CCCGGGAATGTAGAACATCTTG	
NTPDase 2	NTPDase2-Sonde	FAM-CGCTCTTCCGTGGAGTGGTCTTCG-TAM	66 bp
	NTPDase2_fw_TaqMan	CGCGGTTATCGCTTCGA	
	NTPDase2_rev_TaqMan	CGTGCTGCCGCTTCTTT	
Snap25	Snap25-Sonde	FAM-AATTGATGAAGCCAACCAACGTGCAAC-TAM	82 bp
	Snap25_fw_TaqMan	TGGAGAAGGCTGATTCCAACA	
	Snap25_rev_TaqMan	CAAATTTAACCACTCCCAGCAT	
Tas1r2	Tas1r2-Sonde	FAM-TCCTGGTACACCCCGTCCCAT-TAM	147 bp
	Tas1r2_fw_TaqMan	TTCAAAGCATCGCCTCTA	
	Tas1r2_rev_TaqMan	GCACGGGTGGAGGCCTAT	
Tas1r3	Tas1r3-Sonde	FAM-TTCCTCATGCCACAGGTCAGCTATAGTGC-TAM	120 bp
	Tas1r3_fw_TaqMan	TCAGAGCTTGCCCTCATTACAG	
	Tas1r3_rev_TaqMan	TGTGCGGAAGAAGGATGGA	
Tas2r102	Tas2r102-Sonde	FAM-CTCTGGCTTGCCACAACCTCTCAGCG-TAM	89 bp
	Tas2r102_fw_TaqM	GCTGGGTCTTTCTAGTCACTTCA	
	Tas2r102_rev_Taq	CTGCCAGGAGCAGTTAGCTATTC	
Tas2r103	Tas2r103_probe	FAM-TCAGCACAGTGGCCACATAAAAGGC-TAM	72 bp
	TaqMan_T2r103_fw	GTGCCACAGGCTCCAGAGAT	
	TaqMan_T2r103_re	ACAGGAAGGTTACCACAGTTTGC	
Tas2r104	Tas2r104-Sonde	FAM-TGCCGAGCAGTCTACATGAATGCATGA-TAM	91 bp
	Tas2r104_fw_TaqMan	CAAAGTTTTCTTCTGACTATGCT	
	Tas2r104_rev_TaqMan	CAAACGCTCAGATGGTTAATAATTACC	
Tas2r105	Tas2r105-Sonde	FAM-TCATTTGTTGTGAAGGTGATGAAGGACGG-TAM	92 bp
	Tas2r105_fw_TaqM	TGCTAACTTCATGGGTAATCTCCTT	
	Tas2r105_rev_TaqM	GTACATCTCCGAGGTCCTGTTTCT	

2 Materialien und Methoden

Gen- Kurzname	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Amplikon- Länge
Tas2r106	Tas2r106_probe	FAM-CCTGGCAGGTTTAC-TAM	76 bp
	TaqMan_T2r106_fw	TGTTAAAAAGCAGCACAGAAATGTT	
	TaqMan_T2r106_re	AAGAATGTGGCTTACAATGAACTCAT	
Tas2r107	Tas2r107_probe	FAM-CCCTGCGGTCACTCAATCATCGTAATTT-TAM	79 bp
	TaqMan_T2r107_fw	GTTTGACAGCCACATGCCTCTA	
	TaqMan_T2r107_re	GAGGCTTGCTTAACTGCTTATTC	
Tas2r108	Tas2r108-Sonde	FAM-CAGACGGAGGCTCACATGGGTGC-TAM	72 bp
	Tas2r108_fw_TaqMan	AACAGGACCAGCTTTTGAATC	
	Tas2r108_rev_TaqMan	GAGGAAACAGATCATCAGCCTCAT	
Tas2r109*	Tas2r109-Sonde	FAM-ATGCAGCAGCATGTTCCAGGGAGGC-TAM	68 bp
	Tas2r109_fw_TaqMan	TCCCTGTGGACACTTACAAGA	
	Tas2r109_rev_TaqMan	GCCGTGGTTCTGGCATCT	
Tas2r109	probe_Tas2r109_n	FAM-TCCTCACCGCTTTGGCAACTTCTAGAATT-TAM	113 bp
	TM_Tas2r109n_fw	GCATGGACTGGGTTAAGAGAAAA	
	TM_Tas2r109n_rev	GCTAATTGGAAAACCTACTAGCATGA	
Tas2r110	Tas2r110_probe	FAM-AGATGCCAGCACCATGGCCCA-TAM	76 bp
	TaqMan_T2r110_fw	AGGTCAATGCCAAACCACCTA	
	TaqMan_T2r110_re	AGGAAGGAGAACCTGTTTGC	
Tas2r113	Tas2r113_probe	FAM-TGCAGCACACCGCCAAAGGATG-TAM	69 bp
	TaqMan_T2r113_fw	CCCTGTGGAGACATCTGAAGAAT	
	TaqMan_T2r113_re	GCACTGTGGTGCTGATGTCTCT	
Tas2r114	Tas2r114-Sonde	FAM-ATCCCGGCTGCCACTCACTTATCCTAATTC-TAM	77 bp
	Tas2r114_fw_TaqM	GTTTGGTTTGACAACCTGATTCA	
	Tas2r114_rev_TaqM	GCTTCAGCCGACTGTTTCT	
Tas2r115	Tas2r115-Sonde	FAM-AACCATGGCCACACCACAGCC-TAM	74 bp
	Tas2r115_fw_TaqMan	ACCAAAGGATGCAAAGATGTCA	
	Tas2r115_rev_TaqMan	AATAGGAGGAAGGCAACCACAGT	
Tas2r116	Tas2r116_probe	FAM-TGGGTTTCATACCTTTTCTGTGTCAGTGGT-TAM	77 bp
	TaqMan_T2r116_fw	TCCATTTGCCAACCCATGT	
	TaqMan_T2r116_re	GGGAGAAAACAAGAAGGACAAAAG	
Tas2r118	Tas2r118-Sonde	FAM-TCAGCCTGGGCATCTCACATTTCTGTC-TAM	76 bp
	Tas2r118_fw_TaqM	CACCGGTGGAGACGATTCTC	
	Tas2r118_rev_Taq	AAGTTGTATAGCATTGATGTCCACTGT	
Tas2r119	Tas2r119-Sonde	FAM-AACCCAAGACTCAGTGACTTGCCAGTGC-TAM	75 bp
	Tas2r119_fw_TaqM	CAAGAGCTTGGGTCACCTCAA	
	Tas2r119_rev_TaqM	TGTTGGCTGAGTGATGAGTAGCA	
Tas2r120	Tas2r120-Sonde	FAM-CTGTTTTTGGTTGCATATCTTGGGATGGTG-TAM	80 bp
	Tas2r120_fw_TaqM	CTTGTGATTTTCTGGGATCGT	

Gen- Kurzname	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Amplikon- Länge
	Tas2r120_rev_TaqM	CTCATCCAAGCAATCTTCTTGATG	
	Tas2r121_probe	FAM-CATTGGTTGGATCTGCTTTTCTTGGC-TAM	
Tas2r121	TaqMan_T2r121_fw	ATTGGGTCAGGAAAGGAACTCTT	88 bp
	TaqMan_T2r121_re	AACATTTCCCATATCAACACCATT	
	Tas2r122_probe	FAM-TTTCATTCTACTTGGTTGGCCATCTCCAG-TAM	
Tas2r122	TaqMan_T2r122_fw	TGGTTCAAGAATCAGAAAATCTCTGT	91 bp
	TaqMan_T2r122_re	CAGCAATTGTTGTCCATAGAACACA	
	Tas2r123_probe	FAM-TTTCATATTGTTATTCATGCTGTGCCCA-TAM	
Tas2r123	TaqMan_T2r123_fw	CCAGATTCATTATGTCTTGTCTATGC	84 bp
	TaqMan_T2r123_re	GCATTTCTGATCTCCTAGGCAAA	
	Tas2r124_probe	FAM-TACGGCCACAGAAATGCCTTGAGA-TAM	
Tas2r124	TaqMan_T2r124_fw	CAATTCTAGAGGAGATAGAGACCCTAGTG	78 bp
	TaqMan_T2r124_re	AGCAAGAGGAAGGAGACCAAAA	
	Tas2r125_probe	FAM-CCCTGTGGAGACACCTGAAAACCATGC-TAM	
Tas2r125	TaqMan_T2r125_fw	TTGGCTTTTCTGCTTCTCATCTT	79 bp
	TaqMan_T2r125_re	TGTCTTCGGAGCCTTTAGCATAG	
	Tas2r126_probe	FAM-TCTTCACTGGGACTTCTGAACTCAGCCA-TAM	
Tas2r126	TaqMan_T2r126_fw	TGCCCGGCAGCTCATTA	71 bp
	TaqMan_T2r126_re	TGAGCCAGGTACAAAACCAGAA	
	Tas2r129_probe	FAM-CAGAGATGTCCTTGCGAGATGCCACA-TAM	
Tas2r129	TaqMan_T2r129_fw	TGCAACAGCATGCACAAAGA	72 bp
	TaqMan_T2r129_re	TGACCATGGTTTGCAAGACTCT	
	Tas2r130_probe	FAM-TCCTGGCCCTGTTTGTGTCTACTGCC-TAM	
Tas2r130	TaqMan_T2r130_fw	TGAAAGCCATGAAAGCAGTAATTT	79 bp
	TaqMan_T2r130_re	CTGGAGGTGGCTATGAGAAAGG	
	Tas2r131-Sonde	FAM-TAGCCACATTTCCCATCCCCTTTTC-TAM	
Tas2r131	Tas2r131_fw_TaqM	CTGCCTGAGCATATTCTACTTATTCAA	83 bp
	Tas2r131_rev_TaqM	CACCTCTCAATCTCCACTTAAACCA	
	Tas2r134_probe	FAM-AGGGCCTCCCTGCAGGTGACATG-TAM	
Tas2r134	TaqMan_T2r134_fw	GGCAGGGAATGGGTACGAA	73 bp
	TaqMan_T2r134_re	ACCTGGAGGCAGCTAAGCAA	
	Tas2r135_probe	FAM-TGGCTAAAGTACAGTTGCCTGGGTGG-TAM	
Tas2r135	TaqMan_T2r135_fw	AACCTTAACCCATCCTGTCTTTGT	74 bp
	TaqMan_T2r135_re	CACTGAGCAGCATCCATGGT	
	Tas2r136_probe	FAM-CCAGGGCCCCAGTGCTTCAACC-TAM	
Tas2r136	TaqMan_T2r136_fw	CAATGAGGCTTTATGGAAAAGGA	77 bp
	TaqMan_T2r136_re	TGAGATCAAAACTTGCAAAACCTTA	

2 Materialien und Methoden

Gen-Kurzname	Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Amplikon-Länge
Tas2r137	Tas2r138-Sonde	FAM-CCTGCAGGGCCTTCTGCTTCTGG-TAM	78 bp
	Tas2r138_fw_TaqM	GTCTCAGCATCACTCGGCTTT	
	Tas2r138_rev_TaqM	GCAGGCGAGCTGAATAGCA	
Tas2r138	Tas2r137_probe	FAM-CTCCCACCCCTCATTCTCTGGCTC-TAM	65 bp
	TaqMan_T2r137_fw	TTCTACTGCCTGAAAATAGCCAGTT	
	TaqMan_T2r137_re	AACAACCACTCTAGAAGCTCTCCATT	
Tas2r139	Tas2r139_probe	FAM-TGCCACTGGCTCCAGAAACCC-TAM	70 bp
	TaqMan_T2r139_fw	ACACACCCTGAACATGAGAAACA	
	TaqMan_T2r139_re	GGCCTGCATATGAGCCTCTATG	
Tas2r140	Tas2r140-Sonde	FAM-CAGAGACCCAGCACCACAGCCC-TAM	70 bp
	Tas2r140_fw_TaqMan	ATGCAACACAATGCCAAAGACT	
	Tas2r140_rev_TaqMan	CCATCATTTGCAGGGCCTTA	
Tas2r143	Tas2r143-Sonde	FAM-TCTCTCATCATAGGTGGCCTGTCAGCTG-TAM	68 bp
	Tas2r143_fw_TaqMan	TCCCAGGCTGCTGGTTGT	
	Tas2r143_rev_TaqMan	AGTTCGCTGGCTGAAAT	
Tas2r144	Tas2r144-Sonde	FAM-CCCCACTGGTGAGAACCTTATGTTGATGC-TAM	76 bp
	Tas2r144_fw_TaqMan	GAATGGGTCAGGAGCAAAGAC	
	Tas2r144_rev_TaqMan	GTAGCAACAGCCTGGAAAACTC	
β-Aktin	beta-actin-Sonde	FAM-TTGAGACCTTCAACACCCAGCCA-TAM	103 bp
	beta-actin_fw	TACGACCAGAGGCATACAG	
	beta-actin_rev	GCCAACCGTGAAAAGATGAC	

Tas2r109* weist zu 99% auch Tas2r117 nach, weshalb eine weiterer Tas2r109-Assay generiert wurde.

Weitere Primer-Sonden-Sets wurden als fertige Mixe (*TaqMan Gene expression assays*) bei der Firma *Applied Biosystems Life Technologies GmbH*, Darmstadt, D (ABI) bestellt.

Tabelle 12. Primer-Sonden-Sets (*Gene Expression Assays*) für *Real-Time-PCR* von ABI

Gen-Kurzname	Assay ID	NCBI Gen-Referenz(en)	Amplikon-Länge
Tas1r1	Mm00473433_m1	NM_031867.2	79 bp
Tas1r2	Mm00499716_m1	NM_031873.1,AY032623.1,AF337041.1,BC144879.1,BC137740.1	83 bp
Tas2r106	Mm01702023_s1	NM_207016.1, BC107179.1, BC107180.1	113 bp
Tas2r113	Mm01702024_m1	NM_207018.1	74 bp
Tas2r115	Mm01160239_s1	NM_207020.1,BC138393.1,BC138398.1	105 bp
Tas2r117	Mm04213039_s1	NM_207021.1, BC132206.1, BC132208.1	103 bp
Tas2r140	Mm03011269_s1	NM_021562.1,BC145967.1,BC145965.1	104 bp
Tas2r143	Mm01700139_s1	NM_001001452.1,BC111103.1,BC148239.1	114 bp
Tas2r144	Mm01700149_s1	NM_001001453.1	83 bp

2.1.8 Lösungen und Puffer

Zusammensetzungen der eigens hergestellten Puffer-Lösungen sind jeweils nach der methodischen Beschreibung der jeweiligen Experimente ausgewiesen.

2.1.9 Futtermittel

Tabelle 13. Futtermittel

Bezeichnung	Vertrieb
Haltungsfutter Ratte/Maus (V1534-0)	Ssniff, Soest, D
Zuchtfutter Maus (V1124-0)	Ssniff, Soest, D

2.1.10 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden ausschließlich Mäuse (*Mus musculus*) verwendet. Dabei handelte es sich entweder um Labor-Inzucht-Mausstämme, oder um genetisch veränderte Mauslinien mit folgenden Bezeichnungen:

Tabelle 14. Übersicht über verwendete Mausstämme und deren Herkunft

Mausstamm	Kurzname	Herkunft	Referenz(en)
C57BL/6	BL/6	<i>Elevage Janvier</i> (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich)	
R26:lacZ/DT-A	R26 ^{DTA}	Prof. Dr. Ulrich Boehm (ZMNH, Hamburg, D)	(Brockschnieder, Pechmann <i>et al.</i> 2006)
Tas2r131 ^{BL-IRES-hrGFP}	Tas2r131 ^{BLiG}	Dr. Anja Voigt, <i>DIfE</i>	(Voigt 2011; Voigt, Hübner <i>et al.</i> 2012)
Tas1r1 ^{BL-IRES-mCherry}	Tas2r131 ^{BLiR}	Dr. Anja Voigt, <i>DIfE</i>	(Voigt 2011; Voigt, Hübner <i>et al.</i> 2012)
Tas2r131 ^{F/MBLF/M-IRES-cre}	Tas2r131 ^{BLiC}	Dr. Anja Voigt, <i>DIfE</i>	(Voigt 2011)

Mauslinien, die modifizierte Geschmacksrezeptorloci aufweisen, wurden von Dr. Anja Voigt (Abteilung Molekulare Genetik, *DIfE*) in Zusammenarbeit mit dem *Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg* (ZMNH) generiert:

2.1.10.1 Tas2r131^{BL-IRES-hrGFP} (Tas2r131^{BLiG})

Bei dieser *Knock-out-/Knock-in*-Mauslinie wurde durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen die kodierende Sequenz von *Tas2r131* durch ein *Targeting*-Konstrukt (*BL-IRES-hrGFP*) ersetzt (Voigt 2011; Voigt, Hübner *et al.* 2012). Dabei kodiert *BL* (*barley lectin*) für ein Gerstenlektin, *hrGFP* (*humanized renilla Green Fluorescent Protein*) für ein stationäres grün fluoreszierendes Protein. *IRES* (interne ribosomale Eintrittsstelle) gewährleistet die unabhängige Translation der beiden Proteine.

2.1.10.2 Tas1r1^{BL-IRES-mCherry} (Tas2r131^{BLiR})

Analog zu 2.1.10.1 wurde in dieser *Knock-out-/Knock-in*-Mauslinie durch homologe Rekombination die kodierende Sequenz von *Tas1r1* durch ein *Targeting*-Konstrukt (*BL-*

IRES-mCherry) ersetzt (Voigt 2011; Voigt, Hübner *et al.* 2012). Dabei kodiert *mCherry* (monomeres *Cherry*-Protein) für ein stationäres rot fluoreszierendes Markerprotein.

2.1.10.3 **Tas2r131^{F/MBL_F/M-IRES-Cre} (Tas2r131^{BLiC})**

Bei dieser *Knock-out-/Knock-in*-Mauslinie wurde durch homologe Rekombination die kodierende Sequenz von *Tas2r131* durch ein Konstrukt (*F/MBL_F/M-IRES-Cre*) ersetzt (Voigt 2011). Dabei kodiert *Cre* (*cyclization recombination*) für die ortsspezifische *Cre*-Rekombinase.

Weiterhin wurde eine Reportermauslinie genutzt:

2.1.10.4 **R26:lacZ/DT-A (R26^{DTA})**

Diese, von Prof. Dr. Ulrich Boehm zur Verfügung gestellte, Mauslinie (Brockschnieder, Pechmann *et al.* 2006) zeichnet sich durch die *Cre*-induzierbare Expression des *Diphtherietoxins A* (DTA) unter Kontrolle des ubiquitären ROSA26-Promotors (hier kurz: R26) [ROSA β geo26 (Friedrich und Soriano 1991), (Soriano 1999)] aus. DTA ist ein Translations-hemmendes Gift, welches in der Natur durch den Erreger der Diphtherie, *Corynebacterium diphtheriae*, abgesondert wird. Durch die Inaktivierung des Elongationsfaktors EF-2, sterben DTA exprimierende Zellen. Ohne *Cre*-Rekombinase vermitteltes Ausschneiden der direkt vor der DTA-Sequenz lokalisierten LacZ-Stopp-Sequenz, welche mit loxP-Erkennungsstellen flankiert ist, kommt es jedoch zu keiner DTA-Expression.

Um für einige Versuche ein Absterben der *Tas2r131* exprimierenden Zellen hervorzurufen, wurden Tiere der R26:lacZ/DT-A-Mauslinie mit *Tas2r131^{BLiC}*-Mäusen verpaart. So führt in **Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}**-Nachkommen die *Cre*-vermittelte Expression des DTA zum Verlust der *Tas2r131*-Zellen; **Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}**- und **Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/+}**-Mäuse besitzen jeweils noch alle *Tas2r131* exprimierenden Zellen und dienen in den Experimenten als Kontrolltiere.

2.1.11 Verbrauchsmaterialien/-lösungen und Zubehör

Tabelle 15. Verbrauchsmaterialien/-Lösungen und Zubehör

Bezeichnung	Vertrieb
6x Orange Loading Dye Solution	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D
Agarose-Low Melting/Gelling Temperature	United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA
BAPTA, tetrasodium salt *cell impermeant*	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
BD Cell-Tak™ Cell and Tissue Adhesive	BD Biosciences, Bedford, USA
Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Dako Antibody Diluent	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Dako Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Dako Pen	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Deckgläser (24 mm x 60 mm)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
dNTP Set, molecular biology grade (4 x 100 μ mol)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D

Bezeichnung	Vertrieb
Einmal-Injektions-Kanüle 0,04 x 20 mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Einmalspritze <i>Omnifix-F 1ml</i>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Heringsperma-DNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Glaskanülen, <i>GB 100T-8P</i>	Science Products GmbH, Hofheim, D
Glaskanülen, <i>GB 150T-8P</i>	Science Products GmbH, Hofheim, D
<i>Jung Tissue Freezing Medium</i>	Leica Mikrosysteme GmbH, Nussloch, D
Labortiereinstreu	Abedd, Wien, A
<i>MicroAmp[®] Fast Opical 96-Well Reaction Plate</i>	Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, USA
<i>MicroAmp[®] Opical Adhesive Film</i>	Life Technologies Corporation, Foster City, California, USA
<i>No. 1 Glass Coverslip 12 mm Round CS-12R (Warner Instrument)</i>	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
Nylon-Membran <i>Hybond-N⁺</i>	GE Healthcare, Freiburg, D
Objektträger <i>Superfrost Plus[®]</i>	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
<i>Parafilm M</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
PCR Tube Strips (0,2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Random Primer (3 µg/µl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>Recording/Perfusion Chamber RC-25 (Warner Instruments)</i>	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
<i>RNASE AWAY</i>	Molecular Bio Products, Schwerte, D
<i>S.O.C. Medium</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>Safe-Lock Tubes (1,5 ml; 2,0 ml)</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
<i>Series 20 Platform P-4 (Warner Instrument)</i>	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
<i>Series 20 Stage Adapter SA-TS100</i>	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
<i>Silicone Lubricant 111 (NSF, USA)</i>	Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, D
<i>Stainless Steel Beads, 5 mm</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, D
t-RNA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
<i>Trypsin inhibitor, Type I-S: From Soybean</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<i>Ultra-pure water</i>	Biochrom AG, Berlin, D
<i>UltraPure™ Agarose</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

2.1.12 Geräte und Gebrauchswaren

Tabelle 16. Geräte und Gebrauchswaren

Gerät	Hersteller oder Vertrieb
<i>7500 Fast Real-Time PCR System</i>	Applied Biosystems Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Analysewaage <i>Acculab Atilon</i>	Sartorius AG, Göttingen, D

2 Materialien und Methoden

Gerät	Hersteller oder Vertrieb
Binokularmikroskop <i>CH30</i>	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, D
Binokularmikroskop <i>SMZ 645</i>	Nikon, Amstelveen, NL
Binokularmikroskop <i>ZOOM 2000</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
<i>BPS-8 Valve Control System + ALA-VM-8 (ALA Scientific Instruments)</i>	HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, Lambrecht, D
Geldokumentationsanlage <i>GeneGenius Bio Imaging System</i>	Syngene, Cambridge, UK
Gelelektrophorese-Apparatur <i>Horizon® 11-14</i>	Biometra, Göttingen, D
Gelelektrophorese-Apparatur <i>Horizon® 58</i>	Biometra, Göttingen, D
<i>Gradient Cycler PTC-200 Peltier Thermal Cycler</i>	MJ Research Inc., St. Bruno (Quebec), CDN
Digital monochrome CCD Kamera <i>Andor Clara E</i>	Andor Technology, South Windsor, USA
Insektennadeln, rostfrei, Gr.000	Biologie-Bedarfshandel Thorns, Göttingen, D
Konfokales <i>Laserscanning</i> -Mikroskop <i>Leica TCS SP2</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Kontrolleinheit <i>Realtime TILL Imaging</i>	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
Kryostat <i>Microm HM 560</i>	Thermo Scientific, Walldorf, D
Kühlzentrifuge <i>Centrifuge 5417 R</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Lochzange für Ohrmarkierung, 2 mm ø	Ebeco, Castrop-Rauxel, D
<i>Lickometer</i> -System	Coulbourn Instruments, Allentown, USA
<i>Micro Centrifuge</i>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Mikromanipulator <i>5171</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikroskop <i>Axioplan</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, D
Mikroskop <i>Eclipse E 1000</i>	Nikon Instruments, New York, USA
Mikroskop <i>Olympus IX50</i>	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, D
<i>Mirax Scan</i> System	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, D
Monochromator-basierte Beleuchtungseinheit zur Fluoreszenzanregung <i>Polychrome V</i>	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
Peristaltik-Pumpe <i>Pump P1</i>	Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, S
pH-Meter <i>Lab 850 Set</i>	Schott Instruments, Mainz, D
Polycarbonatkäfige Typ II und III mit Edelstahldeckel	Ehret, Emmendingen, D
Präzisions-Präparationsschere mit Federgriffen <i>Vannas Mini-Scissors straight, pointed, 75 mm</i>	Riede Instruments, Emmingen-Liptingen, D
Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur <i>POWER PAC 300</i>	BIO-RAD Laboratories, München, D
Spektralphotometer <i>Nanodrop ND-1000</i>	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Taumelnder Plattformschüttler <i>POLYMAX 2040</i>	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, D
<i>Thermocycler T3000</i>	Biometra GmbH, Göttingen, D
<i>Thermocycler TProfessional</i>	Biometra GmbH, Göttingen, D
<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5415 D</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
<i>TissueLyser II</i>	QIAGEN, Hilden, D
Tränkeflaschen und -kappen	Ehret, Emmendingen, D

Gerät	Hersteller oder Vertrieb
Transilluminator 4000	Stratagene, Amsterdam, NL
Vakuumentrifuge <i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
Uhrmacherpinzette, <i>Dumont</i> , Nr.2, 11 cm	Biologie-Bedarfshandel Thorns, Göttingen, D
Uhrmacherpinzette, <i>Dumont</i> , Nr.3, 11 cm	Biologie-Bedarfshandel Thorns, Göttingen, D
Uhrmacherpinzette, <i>Dumont</i> , Nr.5, 11 cm	Biologie-Bedarfshandel Thorns, Göttingen, D
<i>Vortex-Genie 2</i>	Scientific Industries, New York, USA
Wasserreinigungsanlage <i>TKA</i>	Hartmann GmbH, Hainichen, D

2.1.13 Fluoreszenzfilter-Sets

Tabelle 17. Fluoreszenzfilter-Sets für Mikroskop *Olympus IX50*

Filter-Set	Vertrieb	Anregung	Dichroitischer Strahlteiler	Emission	Verwendung /Nachweis
<i>Fura-2</i>	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D		DCLP 405	LP 440	<i>Fura-2</i>
FITC/BCECF	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D		DCLP 500	LP 515	<i>hrGFP</i>
<i>Fura Red</i>	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D	460/80 nm	BS 511 LP	645/75 nm	<i>Fura Red</i>

Tabelle 18. Fluoreszenzfilter-Sets für *Mirax Scan System*

Filter-Set	Vertrieb	Anregung	Dichroitischer Strahlteiler	Emission	Verwendung/ Nachweis
<i>hrGFP</i>	AHF Analysetechnik AG, Tübingen, D	455–495 nm	495 nm	490–530 nm	<i>hrGFP</i>
<i>F46-008</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, D	540–580 nm	580 nm	590–670 nm	<i>mCherry</i>
<i>FS 44</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, D	455–495 nm	500 nm	505–555 nm	<i>Alexa-Fluor 488</i>
<i>FS 43HE</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, D	540–580 nm	570 nm	570–640 nm	<i>Alexa-Fluor 546</i>

2.1.14 Software

Tabelle 19. Software

Bezeichnung	Vertrieb
<i>Vektor NTI Suite 9</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
<i>Mirax Viewer</i>	Carl Zeiss Mikroskopie, Göttingen, D
Geldokumentationssoftware <i>GeneSnap</i>	Syngene, Cambridge, UK
<i>LCS lite</i>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
<i>IBM SPSS Statistics 20</i>	International Business Machines Corp., New York, USA
<i>Microsoft Office 2010</i>	Microsoft
<i>Live Acquisition Software v.2.1.0</i>	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
<i>Offline Analysis Software v.2.1.0</i>	TILL Photonics GmbH, Gräfelfing, D
<i>Primer Express 3.0</i>	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D
<i>Nanodrop-Software ND-1000 V3.3.0</i>	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
<i>SigmaPlot 11.0</i>	Systat Software GmbH, Erkrath, D
<i>7500 Software v2.0.1</i>	Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt, D

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Standard-PCR

Um eine gewünschte DNA-Sequenz *in vitro* zu amplifizieren wurde folgendes Standard-Protokoll verwendet:

Tabelle 20. Standard-PCR-Ansatz

Komponente	Menge oder Endkonzentration
Matrizen-DNA	ca. 10–100 ng
<i>dNTPs</i>	0,2 mM
Vorwärts-Primer	0,2 µM
Rückwärts-Primer	0,2 µM
<i>Advantage 2 Polymerase Mix, 50x</i>	0,5x
<i>10X Advantage® 2 PCR Buffer</i>	1x
DEPC-Wasser	ad 20-50 µl

Tabelle 21. Standard-PCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer [min:s]
Initiale Denaturierung	95°C	2:00
Denaturierung	95°C	1:00
Anlagerung	60-66°C (Primer-spezifisch)	1:00
Elongation	68°C	0:40–1:30 (abhängig von erwarteter PCR-Produkt-Länge)
Wiederholung von Denaturierung bis Elongation (20–40 Zyklen)		
Finale Elongation	68°C	2:00
Kühlung der Proben	4°C	∞

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Abhängig von der zu erwartenden Größe der Fragmente, wurden Gele mit einer Konzentration von 1% bis 4% (*w/v*) Agarose in 1x Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE-Puffer) hergestellt und mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA wurde dann für 20 bis 45 Minuten bei 90 Volt in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *GeneSnap*.

1x TAE-Puffer (Tris/Acetat/EDTA-Puffer)

40 mM Tris-HCl
 2 mM Essigsäure
 1 mM EDTA

2.2.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um nach der PCR Proben von überflüssigen PCR-Komponenten zu befreien, wurden diese zunächst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, um danach einzelne DNA-Banden aus dem Gel zu isolieren. Dazu wurden diese mit einem Skalpell ausgeschnitten und gemäß der Herstelleranleitung mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gelband Purification Kits* aufgearbeitet.

2.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren erfolgte mittels Spektralphotometer *Nanodrop ND-1000* mit der dazugehörigen *Nanodrop-Software ND-1000 V3.3.0* genutzt. Dazu wurde 1 µl der Probe je Messung verwendet. Dabei wurden Konzentration und Reinheit wässriger Nukleinsäurelösungen anhand der ermittelten Absorptionen bei 260 nm (A260) und 280 nm (A280) automatisch berechnet. Das Verhältnis der gemessenen Extinktionen A260/A280 gab Auskunft über die Reinheit der Proben. Idealerweise sollte dieser Quotient für DNA-Proben bei 1,6 bis 1,8 und für RNA-Proben bei ca. 2,0 liegen.

2.2.1.5 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma *Eurofins MWG Operon* (Martinsried, D) durchgeführt. Dafür wurden die Proben nach den Angaben zum *DNA Sequencing* (<http://www.mwg-biotech.com/>) vorbereitet und der Firma zugesendet. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzen erfolgte mit der Anwendung *ContigExpress* der *Vektor NTI Suite 9* Software.

2.2.1.6 Genotypisierung von Mäusen

2.2.1.6.1 Isolation genomischer DNA aus Mausschwanzspitzen

Zur Genotypisierung von Mäusen wurden im Allgemeinen Schwanzbiopsien von circa zwei Millimeter Länge entnommen, um daraus genomische DNA zu gewinnen. Im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit wurden zwei verschiedene Methoden zur Aufreinigung von genomischer DNA aus Mausschwanzbiopsien verwendet.

Im ersten Protokoll wurden die Schwanzbiopsien in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und bei 55 °C und 300 rpm über Nacht im *Thermomixer* lysiert. Am Folgetag erfolgte eine Fällung der DNA durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion. Das Pellet wurde in 100 µl H₂O aufgenommen und 2 µl einer 1/10-Verdünnung für eine Genotypisierungs-PCR verwendet.

Lysepuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)

100 mM EDTA

100 mM NaCl

1 % SDS

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

Die andere Möglichkeit zur Durchführung einer DNA-Isolation aus Schwanzbiopsien war mittels *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit*. Dabei wurde der Anleitung des Herstellers gefolgt.

2.2.1.6.2 Genotypisierungs-PCRs

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde entweder ein Standard-PCR-Protokoll (2.2.1.1, Seite 37) genutzt, oder, wenn die DNA-Proben mit dem *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit* aufgearbeitet worden waren, das folgende Protokoll:

Tabelle 22. PCR-Ansatz für Genotypisierung mit *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit*

Komponente	Menge oder Endkonzentration
Maus-DNA-Lösung	1 µl
2x <i>Phire Animal Tissue PCR Buffer</i>	1x
Vorwärts-Primer	0,25 µM
Rückwärts-Primer	0,25 µM
<i>Phire Hot Start II</i> DNA Polymerase	0,4 µl
DEPC-Wasser	ad 20 µl

Tabelle 23. PCR-Programm für Genotypisierung mit *Phire Animal Tissue Direct PCR Kit*

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer [min:s]
Initiale Denaturierung	98 °C	5:00
Denaturierung	98 °C	0:05
Anlagerung	60–72 °C (Primer-spezifisch)	0:05
Elongation	72 °C	0:10–0:20 (abhängig von PCR-Produkt-Länge)
Wiederholung von Denaturierung bis Elongation (40 Zyklen)		
Finale Elongation	72 °C	1:00
Kühlung der Proben	4 °C	∞

Sequenzen und Anlagerungs-Temperaturen der genutzten Genotypisierungs-Primer sind in 2.1.7 Oligonukleotide, Tabelle 8 auf Seite 26 zu finden.

2.2.2 **Haltungs- und Zuchtbedingungen von Versuchstieren**

Für Experimente verwendete Mäuse wurden gemäß den Richtlinien des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland und den Empfehlungen zur tierschutzgerechten Haltung von Versuchstieren (GV-SOLAS, 2007) im Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (*Dife*) gehalten.

In den Tierräumen herrschte ein konstanter Hell/Dunkel-Zyklus, wobei die Hellphase von 6–18 Uhr auftrat. Die Raumtemperatur betrug 22 °C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 ± 5%. Die Mäuse wurden in Polycarbonatkäfigen mit Edelstahldeckel, Einstreu und einem Papiertuch als Nistmaterial gehalten. Sie erhielten pelletiertes Standardhaltungsfutter (Tabelle 13) für Mäuse sowie Trinkwasser *ad libitum*. Für die Zucht

wurde pelletiertes Zuchtfutter verwendet. Etwa drei Wochen nach ihrer Geburt wurden die Tiere abgesetzt und erhielten zeitgleich eine Ohrmarkierung mit Hilfe einer Lochzange. Außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt eine Schwanzspitzenbiopsie (max. 2 mm) mittels einer Schere zur Gewinnung von Ausgangsmaterial für die Genotypisierung der Mäuse genommen (siehe 2.2.1.6, Seite 38). Nach dem Absetzen wurden die jeweiligen Wurfgeschwister nach Geschlecht getrennt und, wenn möglich, in Gruppen gehalten.

2.2.3 *In-vitro*-Expressionsanalysen

2.2.3.1 Gewebeentnahme zum Nachweis von mRNA mittels RT-PCR

Zur Expressionsanalyse wurden – je nach Fragestellung – verschiedene Organe von Mäusen entnommen. Dazu wurden die Tiere mit einer Überdosis des Inhalationsanästhetikums *Isofluran* (Baxter, Wien, A) getötet. Zur optionalen Blut-Gewinnung wurde anschließend eine Herzpunktion durchgeführt. Erfolgte keine Herzpunktion, wurde zusätzlich nach Überdosis des Anästhetikums eine Zervikale Dislokation durchgeführt. Danach wurden weitere gewünschte Gewebe entnommen. Diese wurden direkt in *Safe-Lock Tubes (2,0 ml)* überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für eine Anreicherung von Geschmacksknospen wurde eine **Zungenepithel-Isolation** durchgeführt (**Abbildung 5**). Dafür wurde nach Tötung des Tieres sofort die ganze Zunge entnommen und in *Normal Tyrodes* auf Eis aufbewahrt. Nach Injektion eines Enzymgemisches unter das Epithel der Zunge ($\sim 150\ \mu\text{l}$ um Wall- und Blätterpapillen herum; $\sim 150\ \mu\text{l}$ in die Zungenspitze zur Isolation von Pilzpapillen-angereichertem Epithel), inkubierte diese für 20 Minuten in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem *Tyrodes* unter Zufuhr von Luft (Linde, München, D). Anschließend erfolgte die Isolation des Epithels vom restlichen Zungengewebe. Dafür wurde die Zunge in einer *SYLGARD*-haltigen Petrischale mit Insektennadeln befestigt, um anschließend mit einer Präzisions-Präparationsschere mit Federgriffen um die gewünschten Papillen herum das Epithel auszuschneiden und dieses dann mit Hilfe einer Pinzette so abzuziehen, dass es sauber vom restlichen Zungengewebe getrennt war. Nach Spülen des Epithels in *Normal Tyrodes*, wurde dieses sofort in ein *Safe-Lock Tube (2,0 ml)* überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für viele Analysen wurden die Epithelien, welche mit Wall- und Blätterpapillen angereichert waren, je Maus gepoolt, d. h. in dasselbe *Safe-Lock Tube (2,0 ml)* zur späteren Aufarbeitung zusammengeführt.

Auch wurde mit derselben Methode Zungenepithel gewonnen, welches keine Papillen und somit keine Geschmacksknospen enthielt (Abbildung 6).

Enzymgemisch

8 mg Kollagenase A (0,25 U/mg lyo.)

20mg *Dispase II (neutral protease, grade II)* (0.99 U/mg lyo.)

20 mg *Trypsin inhibitor, Type I-S: From Soybean*

4 mg *DNase I, from bovine pancreas* ($>2000\text{ U/mg}$)

in *Normal Tyrodes*

2 Materialien und Methoden

Normal Tyrodes (pH 7,4)

10 mM NaPyruvat
 135 mM NaCl
 5 mM KCl
 2 mM CaCl_2
 1 mM MgCl_2
 10 mM HEPES
 10 mM Glucose
 5 mM NaHCO_3

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier Tyrodes (pH 7,4)

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

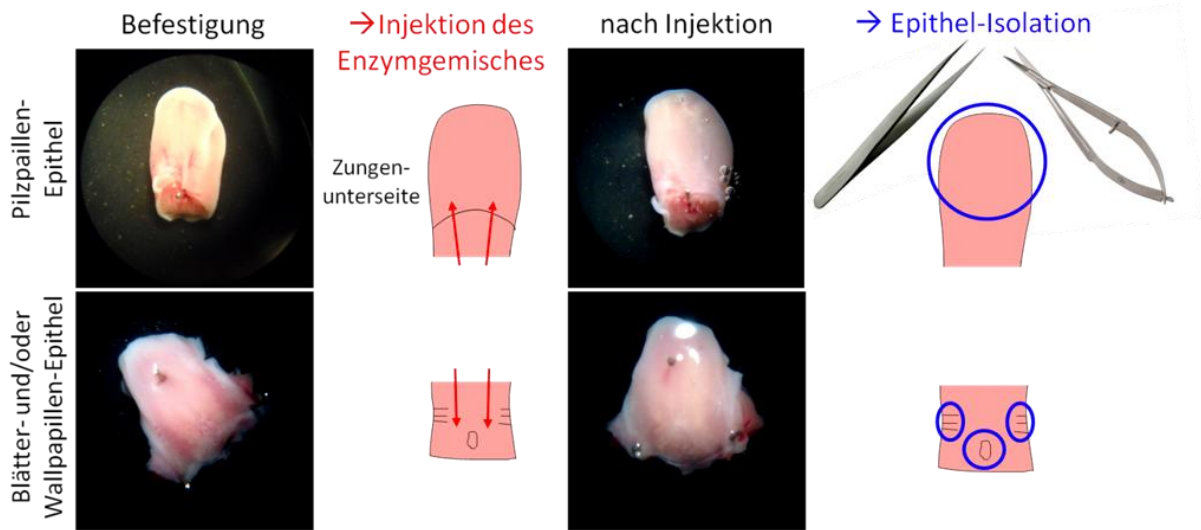


Abbildung 5: Darstellung der Isolation von mit Geschmacksknospen angereichertem Zungenepithel.

Gezeigt sind die einzelnen Schritte der Isolation für Pilzpapillen-Epithel (obere Bildreihe) und Blätter- und/oder Wallpapillen-Epithel (untere Bildreihe): Zuerst wird die frisch entnommene, in *Normal Tyrodes* auf Eis aufbewahrte Mauszunge (oder Zungenteile) in einer *SYLGARD*-haltigen Petrischale mit Insektennadeln festgesteckt. Danach erfolgt, wie im Text (2.2.3.1) beschrieben, die Injektion des Enzymgemisches, die hier schematisch dargestellt und mit roten Pfeilen gekennzeichnet ist. Nach der Injektion erscheinen die entsprechenden Zungenteile aufgebläht. So werden diese für 20 Minuten in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem *Tyrodes* unter Zufuhr von Luft inkubiert (nicht gezeigt). Danach werden die in der Abbildung blau markierten Epithel-Gewebestücke mit einer Präzisions-Präparationsschere mit Federgriffen ausgeschnitten und mittels Uhrmacherpinzette abgezogen.

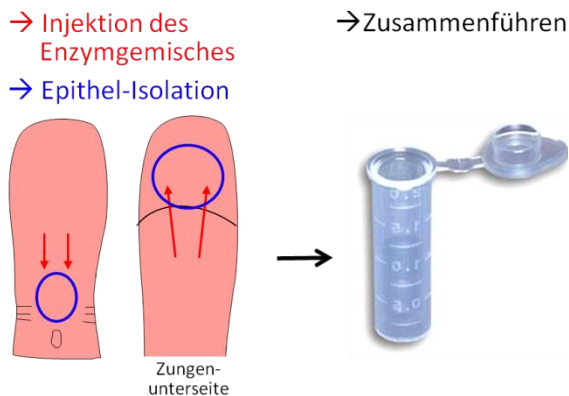


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Enzym-Injektions- bzw. Isolationsorte zur Isolation von Geschmacksknospen-freiem Zungenepithel.

In die mit Pfeilen gekennzeichneten Stellen der Mauszunge werden $\sim 200 \mu\text{l}$ Enzymgemisch unters Epithel injiziert. Die blau gekennzeichneten, Geschmacksknospen-freien Epithelstückchen werden ausgeschnitten, abgezogen und in einem *Safe-Lock Tube* (2,0 ml) zusammengeführt.

2.2.3.2 RNA-Isolation

Zu dem sich im *Safe-Lock Tube (2,0 ml)* befindlichen Gewebe(stück) wurde, je nach dessen Größe, 500 µl oder 1 ml *TRIzol® Reagent* pipettiert. Außerdem wurde ein Kügelchen der *Stainless Steel Beads, 5 mm* ins Reaktionsgefäß dazu gegeben. Nach einer Gewebe-Homogenisierung im *TissueLyser II* wurden die Proben fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um sie danach mit 0,2 Volumen Chloroform zu versetzen. Nach mehrmaligem Invertieren erfolgte eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für drei Minuten, gefolgt von einer 15minütigen Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C. Danach wurde der wässrige Überstand vorsichtig abgenommen und in ein *Safe-Lock Tube (1,5 ml)* überführt. Die Probe wurde mit einem Volumen Isopropanol versetzt, mehrmals invertiert und bei -20 °C mindestens 30 min oder über Nacht inkubiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Das dabei entstandene Pellet wurde zum Waschen mit 200–500 µl 75%igem Ethanol versetzt, das Gefäß mehrmals invertiert und für zehn Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen und das Pellet wurde getrocknet, gegebenenfalls in einer Vakuumzentrifuge. Das Pellet wurde in einer der Größe angepassten Menge RNase-freiem Wasser aufgenommen. Eine kurze Zwischenlagerung der RNA-Lösungen erfolgte bei -20 °C, eine dauerhafte Lagerung bei -80 °C.

2.2.3.3 cDNA-Synthese

2.2.3.3.1 DNase-Verdau

Die isolierte Gesamt-RNA wurde zunächst einem *DNase-Verdau* unterzogen. Dafür wurden 1 µg (RNA aus Zungenepithelien oder kleinen Geweben, wie *Epiglottis*) oder 2 µg (RNA aus größeren Gewebestücken) der RNA-Lösung mit *DNase I* (2 U), 1x *DNase I*-Puffer, DTT (8 mM) und *RNase-Inhibitor* (20 U) in einem Volumen von 20 µl für ~30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von EDTA (0,25 mM) und einer Hitzebehandlung bei 65 °C für zehn Minuten. Die Proben wurden anschließend sofort auf Eis gelagert und zur Reversen Transkription eingesetzt. Bei längerer Unterbrechung des Protokolls erfolgte eine Zwischenlagerung der RNA-Lösungen bei -20 °C.

2.2.3.3.2 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurde die *DNase*-behandelte RNA-Lösung zunächst mit 6 µg *Random Primers* und dNTPs (1 mM) versetzt und fünf Minuten bei 65 °C inkubiert, um eventuell störende Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen. Danach wurde der Probenansatz zu gleichen Mengen in sogenannte +RT- und -RT-Ansätze aufgeteilt. Für den +RT-Ansatz wurden folgende Komponenten zugefügt: 1x *First-Strand Buffer* (geliefert mit Reverser Transkriptase), DTT (4,5 mM bei *SuperScript™ II* oder 9 mM bei *SuperScript™ III*), MgCl₂ (1 mM) und *RNase-Inhibitor* (10 U). Für den -RT-Ansatz, der als Kontrolle diente, wurden die gleichen Komponenten, aber anstatt Reverser Transkriptase Wasser zugefügt. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei

Raumtemperatur, gefolgt von Reverser Transkription für ein bis zwei Stunden bei 42 °C (*SuperScript™ II*) oder bei 50 °C (*SuperScript™ III*) und der Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 Minuten bei 70 °C im *Thermocycler*. Die erhaltene cDNA-Lösung wurde bei –20 °C gelagert. Um zu überprüfen, ob der *DNase*-Verdau vollständig verlief und keine Verunreinigung durch genomische DNA in der cDNA-Lösung vorlag, wurde im Anschluss an die Reverse Transkription zunächst eine PCR mit Intron-überspannenden Primern für das *β-Aktin*-Gen (siehe Tabelle 9, Seite 26) durchgeführt, sodass bei einer Amplifikation aus genomischer DNA ein etwas größeres PCR-Fragment (895 bp) entsteht, als aus der cDNA (441 bp).

2.2.3.4 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Für RT-PCRs wurde standardmäßig folgendes Protokoll verwendet:

Tabelle 24. Standard-RT-PCR

Komponente	Menge oder Endkonzentration
cDNA	1/20 oder 1/40 der hergestellten cDNA-Lösung (2.2.3.3.2)
dNTPs	0,2 mM
Vorwärts-Primer	0,2 µM
Rückwärts-Primer	0,2 µM
<i>Advantage 2 Polymerase Mix, 50x</i>	0,5x
<i>10X Advantage® 2 PCR Buffer</i>	1x
DEPC-Wasser	ad 20–50 µl

Tabelle 25. Standard-RT-PCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer [min:s]
Initiale Denaturierung	95 °C	2:00–5:00
Denaturierung	95 °C	1:00
Anlagerung	60–66 °C (Primer-spezifisch; siehe Tabelle 9)	1:00
Elongation	68 °C	0:40–1:30 (abhängig von erwarteter PCR-Produkt-Länge)
Wiederholung von Denaturierung bis Elongation (20–40 Zyklen)		
Finale Elongation	68 °C	2:00
Kühlung der Proben	4 °C	∞

2.2.3.5 Quantitative Reverse Transkription-PCR (qRT-PCR)

Zur quantitativen Analyse der Genexpression wurde der Ansatz einer relativen Quantifizierung mittels Referenzgen genutzt. Dazu wurde in einer PCR die Zielgensequenz im Vergleich zur Referenzgensequenz von β -Aktin, einem sogenannten *Housekeeping*-Gen, ko-amplifiziert. Die Ergebnisse des *Housekeeping*-Gens wurden in der späteren Auswertung zur Normierung verwendet, wobei der ermittelte C_T -Wert als Berechnungsgrundlage ausschlaggebend war.

2.2.3.5.1 TagMan-Assays - Funktionsweise

Innerhalb dieser Analysen wurde ein Primer-Sonden-System (sogenannte *TagMan-Assays*) genutzt, welches eine hohe Spezifität bei der Messung der Amplifikation aufweist. Es besteht aus Primern, welche in der Lage sind eine kurze, spezifische Sequenz (60–150 bp) zu amplifizieren und einer Sonde (20–30 bp), die innerhalb der zu amplifizierenden Sequenz zwischen den beiden Primer-Sequenzen binden kann. An das 5'-Ende dieser Sonde ist ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff (z. B. FAM) kovalent gebunden, am 3'-Ende ist ein *Quencher*-Farbstoff (z. B. TAMRA) geknüpft. Nach einer sequenzspezifischen Anlagerung von Sonde und PCR-Primern, findet, während der Primer-Extension, eine Sonden-Hydrolyse durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-Polymerase statt. Wird das PCR-Produkt vollständig synthetisiert, werden die an der Sonde gebundenen Farbstoffe voneinander getrennt, und es kann ein Fluoreszenz-Signal detektiert werden. Somit steigt in Abhängigkeit der Zahl freigesetzter Reporter-moleküle auch das Reporter-Signal proportional zur amplifizierten DNA-Menge.

Da eine Hydrolyse der Sonde nur dann erfolgen kann, wenn es zunächst zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielgensequenz kommt und eine Amplifikation dieser Zielsequenz stattfindet, wird auch nur dann ein Fluoreszenz-Signal generiert. Das bedeutet, dass unspezifische Nebenprodukte nicht detektiert werden.

2.2.3.5.2 Durchführung der Real-Time-PCR mit 7500 Fast-Gerät im 96-Well-Format

Sowohl für Ziel-, als auch für Referenzgen wurden Triplet-Bestimmungen durchgeführt. Dazu wurden cDNA-Verdünnungen so vorbereitet, dass je Einzelreaktion eine berechnete, nun in cDNA umgeschriebene RNA-Menge von 6,25 bzw. 12,5 (oder 25 ng [nur für die Analyse von gastrointestinalen Geweben, siehe Anhang, Seite 163]) in einem Volumen von 5 μ l als Ausgangsmaterial vorlagen. Wichtig ist hierbei, dass die Zielgen- und Referenzgen-PCR exakt das gleiche Ausgangsmaterial haben, d. h., als PCR-Matrize dient immer dieselbe cDNA-Verdünnung. Außerdem wurde ein sogenannter Mastermix hergestellt, indem *TagMan® Gene Expression Master Mix* und Primer-Sonden-Mixe (siehe Tabelle 11 und Tabelle 12, Seite 31) so zusammen pipettiert wurden, dass diese in einem Volumen von 5 μ l im Verhältnis von 1 : 10 vorlagen. Alle vorbereiteten Lösungen wurden gut gemischt. Danach wurden die PCR-Ansätze in eine *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode [0,1 ml]* pipettiert, indem zunächst je 5 μ l des Mastermixes je Einzelreaktion vorgelegt wurden, um danach je 5 μ l cDNA-Verdünnung

nungen zu ergänzen. Somit setzte sich eine Einzel-RT-PCR-Reaktion wie folgt zusammen:

Tabelle 26. Standard-Real-Time-RT-PCR-Ansatz

Komponente	Menge oder Endkonzentration
cDNA	6,25 -25 ng
PCR-Sonde	0,5 μ M
Vorwärts-Primer	1,25 μ M
Rückwärts-Primer	1,25 μ M
2x TaqMan® Gene Expression Master Mix	1x
DEPC-Wasser	ad 10 μ l

Die Platten wurden mit einer Klebefolie (*MicroAmp® Opical Adhesive Film*) versiegelt und kurz zentrifugiert, bevor sie ins PCR-Gerät gestellt wurden.

In der *7500 Software v2.0.1* wurde vor Start des PCR-Programmes in „Experiment Properties“ folgende Optionen gewählt: „Quantitation-Comparative C_T ($\Delta\Delta C_T$)“ und „Standard (~2 hours to complete run)“. In „Plate Setup“ wurde dann die Plattenbelegung festgelegt. Nach Einstellen des Reaktionsvolumens bei „Run Method“ auf 10 μ l, wurde die *Real-Time-RT-PCR* gestartet.

Tabelle 27. Standard-Real-Time-RT-PCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer [min:s]
Vorinkubation (Uracil-DNA-Glycosylase-Verdau)	50 °C	02:00
Taq-Polymerase-Aktivierung, Initiale Denaturierung	95 °C	10:00
Denaturierung	95 °C	00:15
Anlagerung + Elongation	60 °C	01:00
Wiederholung von Denaturierung und Anlagerung + Elongation (40 Zyklen)		

2.2.3.5.3 Aufzeichnung der Daten und C_T -Wert

Während des Verlaufs der *Real-Time-PCR* wird ein sogenannter Amplifikations-Plot aufgezeichnet, d. h., das auf die Gensequenz-Amplifikation beruhende Fluoreszenz-Signal wird über die PCR-Zyklenzahl aufgetragen. Somit entsteht eine Kurve, die bei einer 100%ig effizienten PCR exponentiell ansteigt. Zur Auswertung dieser entstandenen Daten ist der sogenannte C_T -Wert interessant, welcher laut Definition den Punkt der Kurve bezeichnet, an der diese einen Schwellenwert (*Threshold*) übersteigt. Mittels des Programmes des *Real-Time*-Gerätes wird dieser *Threshold* automatisch berechnet, und bezeichnet den Schwellenwert, an welchem die gemessenen Amplifikationskurven derselben Gensequenzen eindeutig über die Hintergrund-Fluoreszenz treten.

2.2.3.5.4 Effizienz-Bestimmung

Die Effizienz der *Real-Time-PCRs* mit den genutzten *TaqMan-Assays* wurde mit Hilfe von Standard-Kurven bestimmt. Dazu wurden *Real-Time-RT-PCRs* wie in 2.2.3.5.2 auf Seite 44 beschrieben durchgeführt. Allerdings wurden für jeden *TaqMan-Assay* fünf verschie-

dene Konzentrationen (min. 0,78125 ng, max. 25 ng) in Triplet-Ansätzen gemessen. Außerdem wurde in „Experiment Properties“ anstatt „Quantitation-Comparative C_T (ΔΔC_T)“ die Option „Quantitation Standard Curve“ ausgewählt. Unter „Define and Set up Standards“ wurden folgende Parameter angegeben bzw. ausgewählt:

- *Points*: 5
- *Replicates*: 3
- *Starting Quantity*: 25 oder 12,5
- *Serial Factor*: 1:2

Mit „allow to define samples“ wurde danach je *Assay* die Plattenbelegung festgelegt und mit „apply“ bestätigt. Nach der Messung wurde eine Standard-Kurve der C_T-Werte über die Ausgangskonzentrationen logarithmisch aufgetragen. Aus dieser erfolgte dann mit der Formel

$$\text{Effizienz} = 10^{(-1 / \text{Anstieg})} - 1$$

in der *7500 Software v2.0.1* automatisch die Effizienz-Berechnung. Dabei konnten nach der Messung auch einzelne, z. B. stark abweichende, Werte aus der Berechnung manuell gestrichen werden.

2.2.3.5.5 Analyse der erhaltenen Daten

Nach Beendigung der PCR wurde über „Analyse Settings“ der *Threshold* jeder Genamplifikation manuell auf 0,2 festgelegt, ein Wert, bei dem die ermittelten Amplifikationskurven immer eindeutig über die Hintergrundfluoreszenz traten. Dies war notwendig, um einen Vergleich der C_T-Werte verschiedener Gene zu ermöglichen.

Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe der 2^{-ΔΔC_T}-Methode (Livak und Schmittgen 2001) oder der Berechnung des 2^{-ΔC_T}-Wertes (siehe auch Reimann, Habib *et al.* 2008):

Zunächst werden dafür die Proben-Werte normalisiert, d. h. der C_T-Wert des Referenzgens, β-Aktin, vom C_T-Wert des Zielgens abgezogen:

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen.}$$

Danach wird vom ΔC_T-Wert der zu untersuchenden Probe der mittlere ΔC_T-Wert der Referenzgruppe (Kontrolle) subtrahiert:

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_T \text{ Referenzgruppe.}$$

Dann wird der relative Expressionsunterschied einer Probe in Bezug auf die Referenzgruppe, die sogenannte Ratio berechnet. Diese ist dann normalisiert auf ein Referenzgen und bezogen auf eine Kontrolle, z. B. eine Referenzgruppe:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$$

Diese Ratio bezeichnet die n-fache Expression im Vergleich zur Referenzgruppe (Kontrolle).

Wurde die Expression verschiedener Gene, z. B. in denselben Geweben, betrachtet und somit keine Referenzgruppe bestimmt, fand ausschließlich eine Normalisierung auf β -Aktin statt. Dann wurde die Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta C_T}$$

genutzt.

Diese Modelle der Berechnung setzen theoretisch eine Verdopplung der DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus voraus, d. h. eine Effizienz der PCR von 100%. Deshalb ist es wichtig, dass die wahren PCR-Effizienzen zumindest sehr hoch und außerdem untereinander vergleichbar sind.

2.2.3.5.6 Untersuchung der Spezifität von qRT-PCR-Assays

Zur Überprüfung ihrer Spezifität wurden PCR-Produkte der qRT-PCR-Assays exemplarisch sequenziert. Da es sich bei den resultierenden PCR-Produkten um sehr kleine Fragmente handelte (siehe Amplikon-Länge Tabelle 11 und Tabelle 12; Seite 28), bedurfte es einer Subklonierung, um diese sequenzieren zu können:

- **Aufreinigung von qRT-PCR-Produkten**

Die Fragmente wurden zunächst, wie in 2.2.1.2, Seite 37, beschrieben, elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde ein 4%iges Agarosegel, bestehend aus 1,5% *UltraPure™ Agarose* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D) und 2,5% *Agarose-Low Melting/Gelling Temperature* (United States Biochemical Corp., Cleveland, Ohio, USA), genutzt. Die erhaltenen Banden wurden ausgeschnitten und mittels des *HiYield® Small DNA Fragments Extraction Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt. Im letzten Schritt dieses Protokolls erfolgte eine Elution mit 25 μ l Wasser.

- **DNA-Ligation, TOPO TA-Klonierung und Transformation**

Nach einer Konzentrationsbestimmung (2.2.1.4) der DNA-Fragmente wurde die Ligation mit dem *Rapid DNA Ligation Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei dieser Reaktion lagen Vektor und Fragment in einem molaren Verhältnis von etwa 1 : 3 vor.

Eine Klonierung mit dem *TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing* erfolgte nach den vom Hersteller empfohlenen Informationen. Die anschließende Transformation wurde in den mitgelieferten kompetenten Zellen *Escherichia coli TOP10* durchgeführt.

Diese wurden auf Eis aufgetaut, mit Plasmid-DNA vermischt und für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im Wasserbad für 30 Sekunden bei 42 °C. Danach wurden die Zellen in 250 μ l *S.O.C. Medium* aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C im Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz auf vorgewärmte LB-Agarplatten mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 μ g/ml) ausgestrichen (zwei Platten mit 50 μ l bzw. 100 μ l) und bei 37 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur über zwei Tage inkubiert.

Danach wurden je Ansatz vier bis fünf Bakterien-Kolonien gepickt, welche wiederum in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) aufgenommen wurden. Diese Ansätze wurden ca. 12–16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

LB-Agarplatten

1 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
136 mM NaCl
1,5 % (w/v) *Select Agar*

LB-Medium

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

- **Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli***

Zur Gewinnung analytischer Mengen an Plasmid-DNA (1-10 µg) wurde das *NucleoSpin® Plasmid Kit* nach der Anleitung des Herstellers verwendet.

- **Restriktions-Kontrollverdau**

In einem 10 µl-Ansatz wurden die erhaltenen Plasmide mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (10 U/µl; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, D) nach Herstellerangaben bei 37 °C für mindestens eine Stunde verdaut. Dann wurden die Restriktions-Ansätze mit je 2 µl 6x Ladepuffer versetzt und zur Analyse nochmals auf ein 4%iges Agarosegel aufgetragen (wie in „Aufreinigung von PCR-Produkten“). Die Laufzeit betrug 40 Minuten bei 90 Volt.

- **Sequenzierung**

Proben, die eine Bande bei der zu erwartenden Größe zeigten, wurden sequenziert (2.2.1.5, Seite 38). Dazu wurden 15 pmol Primer und zwischen 50–100 ng Plasmid-DNA in einem Volumen von 15 µl zusammengefügt.

2.2.4 *In-situ*-Expressionsanalysen

2.2.4.1 Perfusion von Versuchstieren und Gewebepräparation

Für immunhistochemische Analysen und für nachfolgende *ISH* von Gewebeschnitten war es wichtig, dass die dafür verwendeten Gewebe zuvor durchgängig fixiert waren, um so einerseits die Fluoreszenz der Markerproteine, sowie andererseits die RNA-Integrität zu bewahren. Um dies zu gewährleisten, wurde vor der Organentnahme für solche Experimente eine Perfusion der Versuchstiere mit 4%iger PFA-Lösung durchgeführt. (Land Brandenburg, D, Tierversuchsanzeige-Nummer: 23-2347-A-1-1-2010)

Dazu wurde die Maus mit Hilfe einer intraperitonealen Injektion eines Gemisches, aus 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Albrecht GmbH, Aulenburg, D), 10 mg/kg Körpergewicht Xylazin (*Rompun*, Merck; Darmstadt, D) und physiologischer Kochsalzlösung bestehend, zunächst in eine tiefe, letale Narkose versetzt. Sobald das Tier keinen Zwischenzehenreflex mehr zeigte, wurde es auf einer Styroporbox fixiert und dessen Bauchraum geöffnet. Das anschließende Öffnen des Diaphragmas führte zum Kollabieren der Lungen, danach wurde das Herz des Tieres freigelegt. Dieses wurde mit Hilfe einer stumpfen Pinzette fixiert und eine Kanüle in die linke Herzkammer eingeführt. Außerdem erfolgte eine Punktierung des rechten Vorhofs mit einer spitzen Schere, durch die eine Entblutung des Tieres stattfinden konnte. Durch die Kanüle wurden zuerst ca. 20 ml 1x PBS und danach eine 4%ige PFA-Lösung in 1x PBS appliziert.

Nach erfolgreicher Perfusion der Versuchstiere, erfolgte eine Entnahme der gewünschten Organe. Diese wurden für ca. zwei Stunden bei 4 °C in 4%iger PFA-Lösung in 1x PBS nachfixiert. Zum Frostschutz wurden die Gewebe, nachdem sie kurz in 1x PBS gespült wurden, über Nacht in einer 30%igen Saccharose-Lösung in 1x PBS bei 4 °C leicht geschwenkt. Am Folgetag wurden sie auf Trockeneis oder in Einbettmedium (*Jung Tissue Freezing Medium*) eingefroren.

4%ige (w/v) PFA-Lösung in 1x PBS (pH 7,2)

40 g/l Paraformaldehyd (PFA) [bei 60 °C in Wasser lösen]

3 mM NaOH

in 1x PBS

[auf 4 °C abkühlen]

2.2.4.2 Anfertigung von Gefriergewebeschnitten

Von den tiefgefrorenen Geweben wurden mittels Kryostat dünne Gefriergewebeschnitte angefertigt. Dazu wurden diese zunächst auf einer Halterung mit Hilfe von Einbettmedium festgefroren. Danach wurden, je nach Anwendung, zehn bis 14 µm dicke Dünnschnitte auf Objektträger gebracht und bis zum weiteren Prozessieren entweder bei -20 °C für IHC oder bei -80 °C für *ISH* gelagert.

2.2.4.3 Isolation von Maus-Spermatozoen

Zur Isolation von lebenden Spermatozoen wurde eine männliche Maus mittels Inhalationsanästhetikum *Isofluran* und anschließender Zervikaler Dislokation getötet. Nebenhoden sowie Samenleiter wurden entnommen, vorsichtig vom Fettgewebe freipräpariert und in 37 °C warme HS-Lösung überführt, um die Gewebe kurz zu spülen. Dann wurden den Geweben mittels einer scharfen Schere oder einem Skalpell feine Einschnitte zugefügt. Es folgte die Überführung in eine kleine Petrischale gefüllt mit 37 °C warmer HS-Arbeitslösung, wo die Spermien dann etwa zehn Minuten bei 37 °C „ausschwimmen“ konnten. Danach wurde der Überstand, in welchem sich die Spermatozoen befanden, vorsichtig mit einer großen Pipette abgenommen und in ein 2 ml *Safe-Lock Tube* überführt. Nach sanfter Zentrifugation für circa fünf Minuten konnte der Überstand abgenommen und verworfen werden und die Spermatozoen zur Weiterprozessierung in 1x PBS aufgenommen werden.

HS-Lösung

30 mM HEPES
135 mM NaCl
5 mM KCl
2 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
10 mM Glucose
10 mM Lactic Acid
1 mM Pyruvic Acid
[pH mit NaOH auf 7,4 einstellen]

HS-Arbeitslösung mit NaCO₃ (Bicarbonat) und BSA

HS-Lösung
15 mM NaHCO₃ [50 ml HS mit 0,063 g NaHCO₃ versetzen,
nur schwenken, nicht schütteln oder rühren]
0,5% BSA [zu 5 ml Bicarbonatpuffer 0,025 g BSA zugeben,
langsam lösen lassen, auf 37°C aufwärmen]

2.2.4.4 Visualisierung von (Marker-)Fluoreszenzen innerhalb der Gewebe

Die Objektträger wurden dreimal für fünf Minuten in 1x PBS gewaschen. Um die Darstellung der Gewebestrukturen zu ermöglichen, wurden Gewebeschnitte etwa 15 Minuten mit *Alexa Fluor® 633 Phalloidin* (Tabelle 1, Seite 23) angefärbt und danach nochmals in 1x PBS gewaschen. Alle Objektträger wurden kurz in Wasser getaucht, bevor sie mit Eindeckmedium (*Dako*) und einem Deckgläschen versehen wurden.

Um die Spermatozoen-Zellkerne darzustellen, wurden diese außerdem mit *TO-PRO®-3 Iodide (642661)* (Tabelle 1, Seite 23) angefärbt, indem dieser Farbstoff im Eindeckmedium gelöst wurde.

Fluoreszenz-Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskops (*Leica TCS SP2*, Tabelle 16, Seite 34). Dabei wurden *Scanning*-Abstände von 0,5 µm in Z-Ebene und die Laser-Anregungswellenlängen von 488, 561 oder 633 nm benutzt. Die detektierten Emissionswellenlängen betragen jeweils 505–530 nm (bei 488 nm Anregung), 590–630 nm (bei 561 nm Anregung), oder 645–740 nm (bei 633 nm Anregung).

2.2.4.5 Immunhistochemischer Nachweis von α -Gustducin mittels Antikörperfärbung

Um das Protein Gustducin in Zungengewebeschnitten sichtbarzumachen, wurde ein indirekter immunhistochemischer Nachweis angewandt. Für diese sogenannte Gustducin-Antikörperfärbung wurden 10 μ m dicke Gefriergewebeschnitte verwendet, welche zuvor bei mind. $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagerten.

Zur Kontrolle der Spezifität des primären α -Gustducin-Antikörpers diente ein Blockierungs-Peptid, welches etwa vier Stunden vor Inkubation zu vierfachem Volumen mit dem Antikörper in *Dako Antibody Diluent* zusammengefügt wurde und dann auf Eis inkubierte. Das Protokoll zum Nachweis von α -Gustducin mittels Antikörperfärbung erfolgte über zwei Tage und ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 28. Protokoll für immunhistochemischen Nachweis von α -Gustducin

	Behandlung	Lösung	Dauer, Spezifikationen
Tag 1	Waschen	Wasser	2–3 min
	ggf. Schnitte umranden	<i>Dako Pen</i>	
	Waschen	1x PBS	5 min
	Blockierung	<i>Dako Antibody Diluent</i>	30 min
	Inkubation	Primärer Antikörper in <i>Dako Antibody Diluent</i> (1 : 400)	über Nacht, feuchte Kammer, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$
Tag 2	Waschen	Wasser	Kurz
	Waschen	1x PBS	1–2 min
	Waschen	1x PBS-Tween (0,05%)	3x 4 min
	Inkubation	sekundärer Antikörper in <i>Dako Antibody Diluent</i> (1 : 300)	1 h, feuchte Kammer
	Waschen	1x PBS	1–2 min
	Waschen	1x PBS-Tween (0,05%)	3x 4 min
	Waschen	1x PBS	1–2 min
	Inkubation (Kernfärbung)	<i>TO-PRO[®]-3 Iodide (642/661)</i> in 1x PBS (1 : 400)	15 min
	Waschen	1x PBS	5 min
	Tauchen	Wasser	
	Eindecken	<i>Dako Fluorescent Mounting Medium</i>	

2.2.4.6 *In-situ*-Hybridisierung

Um die mRNA von Bitterrezeptoren in Zungengewebeschnitten nachzuweisen, wurde *In-situ*-Hybridisierung (ISH) angewandt.

2.2.4.6.1 Amplifikation zur RNA-Sonden-Generierung verwendeter Matrizen

Zur Generierung von RNA-Sonden aus PCR-Produkten wurden die auf Seite 25 in Tabelle 7 aufgeführten Plasmide mit den jeweils enthaltenen Rezeptorsequenzen als Matrizen für eine PCR eingesetzt. Dabei dienten die den jeweiligen Rezeptor flankierenden *sst*- bzw. *hsv*-Sequenzen als Bindungsstellen für die auf Seite 28 in Tabelle 10 dargestellten Primer, welche in einer 2 mM Endkonzentration in einem 50 µl großen PCR-Ansatz (siehe Seite 37) eingesetzt wurden. Die entstandenen PCR-Produkte wurden zur Überprüfung ihrer korrekten Länge auf ein Agarosegel aufgetragen (2.2.1.2), aufgereinigt (2.2.1.3) und direkt sequenziert (2.2.1.5).

2.2.4.6.2 *In-vitro*-Transkription zur Generierung von RNA-Sonden

Korrekte PCR-Produkte oder linearisierte Plasmide, welche die gewünschte Sequenz enthielten, wurden als Matrize in einer *In-vitro*-Transkription eingesetzt. Dabei wurden, durch Verwendung der DNA-abhängigen RNA-Polymerasen der Bakteriophagen *T3* und *T7*, *in vitro*-markierte *sense*- und *antisense*-RNA-Sonden hergestellt. Dazu inkubierte der folgende Reaktionsansatz für drei Stunden bei 37 °C:

Tabelle 29. Reaktionsansatz – *In-vitro*-Transkription

Komponente	Menge oder Endkonzentration
Matrizen-DNA	250 ng (PCR-Produkt) oder 1 µg (Plasmid)
10x Transkriptionspuffer	1x (5 µl)
10x <i>DIG-RNA-labeling Mix</i>	1x (5 µl)
RNase-Inhibitor <i>RiboLock</i> (40 U/µl)	1 U (1,25 µl)
<i>T3</i> - oder <i>T7</i> -RNA-Polymerase (20 U/µl)	1,2 U (3 µl)
DEPC-Wasser	ad 50 µl

Nach Inkubation wurden die Reaktionsansätze gefällt, um die darin enthaltenen Nukleinsäuren aufzureinigen. Dazu wurden diese mit 1/5 Volumen Ammoniumacetat (10 M) und 2,5-fachem Volumen reinem Ethanol versetzt und 30 Minuten bei -80 °C oder über Nacht bei -20 °C inkubiert. Nach Zentrifugieren (4 °C, 16.000 *g*) und Waschen des entstandenen Pellets mit 75%igem Ethanol, wurde dieses in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in 34 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen.

Dann folgte ein *DNase* I-Verdau (4 U), um die im Sonden-Ansatz enthaltene Matrizen-DNA zu spalten und somit eine mögliche Bindung von DNA-Einzelsträngen während der *In-situ*-Hybridisierung zu verhindern. Die Ansätze wurden nochmals gefällt, wie im letzten Absatz beschrieben. Das wiederum in der Vakuumzentrifuge getrocknete Pellet wurde, je nach Größe, in 25 µl bis 30 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Zur Beurteilung der einzelnen Schritte in der *In-vitro*-Transkription und des *DNase* I-Verdaus

wurden je 2 µl der Reaktionsansätze vor und nach der ersten Fällung entnommen, sowie 0,5 µl nach der zweiten Fällung, welche nach Denaturierung auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen wurden. Die Konzentration der DIG-markierten RNA-Sonden wurde mittels Spektralphotometer (2.2.1.4) bestimmt. Deren Lagerung erfolgte bei -80 °C, hergestellte Verdünnungen der Sonden (20 ng/µl) wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.4.6.3 Dot-Blot-Hybridisierung zur Überprüfung der RNA-Sondenqualität

Um die Funktionstüchtigkeit und die Spezifität der generierten Sonden zu überprüfen, sowie den Einbau der DIG-markierten Nukleotide zu beurteilen, wurde eine *Dot-Blot*-Hybridisierung durchgeführt. Als Matrize wurden auf eine *Hybond-N⁺*-Nylon-Membran verschiedene Verdünnungen von 1000, 100 oder 10 pg/µl der Ausgangs-DNA (siehe 2.2.4.6.1) sowie 1000 pg/µl Leervektor-DNA und ggf. Plasmid-DNA, welche die Gensequenz des nächstverwandten Rezeptors enthielt, als Punkte (1 µl) aufgebracht. Diese Membranen wurden je fünf Minuten denaturiert, neutralisiert und in 1x PBS gespült.

Tabelle 30: *Dot-Blot*-Hybridisierung

	Behandlung	Lösung	Dauer, Spezifikationen
Tag 1	Denaturierung	Denaturierungslösung	5 min
	Neutralisierung	Neutralisierungslösung	5 min
	Waschen	1x PBS	5 min
	Prähybridisierung	Prähybridisierungslösung	3 h, 56 °C
	Hybridisierung	Hybridisierungslösung	über Nacht, 56 °C
Tag 2	Waschen	2x SSC	3x 5 min
	Waschen	0,4x SSC	15 min
	Waschen	1x SSC	2x 1 h, 72 °C
	Äquilibrierung	Puffer 1	5 min
	Blockieren	Puffer 2	1 h
	Inkubation	Anti-DIG-Antikörper (Tabelle 1. Primäre Antikörper, Seite 23) in Puffer 2 (1 : 750)	1 h
	Waschen	Puffer 1	2x 30 min
	Äquilibrierung	Puffer 3	5 min
	Farbreaktion	Farbsubstrat	90 min
	Farbreaktion abstoppen	TE-Puffer	5 min
	Trocknen		

Danach wurden die Membranen mit einem Standard-Scanner eingescannt und ausgewertet.

Denaturierungslösung

0,4 M NaOH
0,6 M NaCl

Neutralisierungslösung

0,5 M TrisHCl (pH 7,5)
1,5 M NaCl

10x PBS (pH 7,4)

0,8 M Na₂HPO₄
0,65 M NaCl
0,2 M NaH₂PO₄

DEPC-Wasser

0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H₂O
[gut mischen]
[anschl. autoklavieren]

20x SSC (pH 7,0)

3 M NaCl
0,3 M NaCitrat

50x Denhardt´s Reagenz

1% (w/v) Ficoll
1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
1% (w/v) Bovines Serumalbumin

Prähybridisierungslösung

50% (v/v) Formamid
5x Hybridisierungssalze
5x Denhardt´s Reagenz
0,2% (w/v) SDS
250 ng/ml yt-RNA
264 ng/ml Heringssperma-DNA

2x Puffer 1 (pH 7,5)

0,3 M NaCl
0,2 M Maleinsäure

Puffer 3 (pH 9,5)

0,1 M NaCl
0,1 M Tris-HCl
0,05 M MgCl₂

RNase-Puffer (pH 7,5)

0,5 M NaCl
0,01 M Tris-HCl
0,001 M EDTA
[frisch aus Stocklösungen herstellen]

20x Hybridisierungssalze (pH 6,8)

3 M NaCl
0,1 M PIPES
0,1 M EDTA

Hybridisierungslösung

10% (w/w) Dextransulfat
in Prähybridisierungspuffer

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

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

Puffer 2

1% *Blocking Reagent* (Roche)
in Puffer 1 lösen

Farbsubstrat

175 µg/ml BCIP
62,5 µg/ml NBT
in Puffer 3 lösen [frisch]

2.2.4.6.4 Vorbehandlung der Gewebe für die *In-situ*-Hybridisierung

Für die Hybridisierung der generierten RNA-Sonden wurden Zungengewebeschnitte folgendermaßen behandelt, soweit nicht anders ausgewiesen fanden die einzelnen Schritte in einer Glasküvette statt:

Tabelle 31: Arbeitsschritte zur Vorbehandlung der Gewebe für die *In-situ*-Hybridisierung

	Behandlung	Lösung	Dauer, Spezifikationen
Tag 1	Fixierung	4%iges PFA (w/v) in 1x PBS, 1 mM MgCl ₂	5–8 min
	Waschen	1x PBS	1 min
	Inkubation	0,2 M HCl	10 min
	Inkubation	1% (v/v) TritonX-100 in 1x PBS	2 min
	Waschen	1 µg Proteinase K (32,4 U) in 1x PBS	5 min
	Waschen	1x PBS	2x 5min
	Fixierung	4%iges PFA (w/v) in 1x PBS, 1 mM MgCl ₂	5 min
	Waschen	1x PBS	5 min
	Acetylierung	0,1 M Triethanolamin (pH 8,0) mit 0,25% (v/v) Essigsäureanhydrid [frisch dazugeben]	10 min
	Waschen	1x PBS	1 min

10x PBS (pH 7,4)

0,8 M Na₂HPO₄
0,65 M NaCl
0,2 M NaH₂PO₄

DEPC-Wasser

0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H₂O
[gut mischen]
[anschl. autoklavieren]

4%ige (w/v) PFA-Lösung in 1x PBS (pH 7,2)

40 g/l Paraformaldehyd (PFA) [bei 60 °C in Wasser lösen]
3 mM NaOH
1 mM MgCl₂
in 1x PBS
[auf 4 °C abkühlen]

2.2.4.6.5 Prähybridisierung und Hybridisierung mit der RNA-Sonde

Zum Blockieren freier Bindungsstellen folgte eine Prähybridisierung der Gewebeschnitte in einer 50% (v/v) formamidhaltigen Kammer für fünf Stunden bei 50 °C. Es wurden dabei 500 µl der zuvor auf 85 °C temperierten Prähybridisierungslösung je Objektträger verwendet.

Für die Hybridisierung wurden anschließend 100 µl Hybridisierungslösung mit 80–120 ng RNA-Sonde gemischt, zur Denaturierung der Sonde zehn Minuten bei 85 °C inkubiert und auf den jeweiligen Objektträger gegeben. Die Gewebeschnitte wurden mit einem Deckgläschen bedeckt und über Nacht in einer 50% (v/v) formamidhaltigen Kammer bei 50 °C hybridisiert.

50x Denhardt's Reagenz

1% (w/v) Ficoll
 1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
 1% (w/v) Bovines Serumalbumin

20x Hybridisierungssalze (pH 6,8)

3 M NaCl
 0,1 M PIPES
 0,1 M EDTA

Prähybridisierungslösung

50% (v/v) Formamid
 5x Hybridisierungssalze
 5x Denhardt's Reagenz
 0,2% (w/v) SDS
 250 ng/ml yt-RNA
 264 ng/ml Heringssperma-DNA

Hybridisierungslösung

10% (w/w) Dextransulfat
 in Prähybridisierungspuffer

2.2.4.6.6 Waschen der Gewebeschnitte

Nach der Hybridisierung wurden die Deckgläschen durch eintauchen in 2x SSC entfernt. Danach wurden folgende Schritte zum Waschen der Gewebeschnitte und Entfernen von nicht-gebundenen Sonden durchgeführt:

Tabelle 32: Waschen der Gewebeschnitte nach *In-situ*-Hybridisierung

	Behandlung	Lösung	Dauer, Spezifikationen
Tag 2	Waschen	2x SSC	3x 5 min
	RNase-Verdau	RNase-Puffer mit <i>RNase A</i> (~1 µg)	15–20 min
	Waschen	0,4x SSC	15 min
	Waschen	0,4x SSC	2x 30 min, 50 °C

20x SSC (pH 7,0)

3 M NaCl
 0,3 M NaCitrat

RNase-Puffer (pH 7,5)

0,5 M NaCl
 0,01 M Tris-HCl
 0,001 M EDTA
 [frisch aus Stocklösungen herstellen]

2.2.4.6.7 Detektion der RNA-Sonden

Die Detektion der im Gewebe gebundenen Sonden konnte auf verschiedene Weise erfolgen. Es wurden immunhistochemische Protokolle mit dem letztlichen Sichtbarmachen der Sonden durch Farbniederschlag durch BCIP und NBT (McGadey 1970) genutzt, oder mittels Fluoreszenz-Nachweis (TSA-Amplifikation). Im besonderen Fall wurde anschließend an den Nachweis der gebundenen RNA-Sonden zusätzlich eine optionale hrGFP-Antikörperfärbung auf denselben Gewebeschnitten durchgeführt, welche in Tabelle 34 mit aufgeführt ist.

2 Materialien und Methoden

Tabelle 33: Detektion der RNA-Sonden durch BCIP und NBT

	Behandlung	Lösung	Dauer, Spezifikationen
Tag 2:	Äquilibrierung	Puffer 1	5 min
IHC-Nachweis	Blockieren	Puffer 2	1 h, feuchte Kammer mit 4x SSC
	Inkubation	Anti-DIG-AP (Tabelle 1. Primäre Antikörper, Seite 23) in Puffer 2 (1 : 750)	1 h, feuchte Kammer mit 4x SSC
	Waschen	Puffer 1	2x 30 min
	Äquilibrierung	Puffer 3	5 min
	Farbreaktion	Farbsubstrat	über Nacht
Tag 3:	Farbsubstrat ablaufen lassen		
IHC-Nachweis	Farbreaktion abstoppen	TE-Puffer	≥ 5 min
	Eindecken	<i>Dako Fluorescent Mounting Medium</i>	

2x Puffer 1 (pH 7,5)

0,3 M NaCl
0,2 M Maleinsäure

Puffer 2

1% *Blocking Reagent* (Roche)
in Puffer 1 lösen

Puffer 3 (pH 9,5)

0,1 M NaCl
0,1 M Tris-HCl
0,05 M MgCl₂

Farbsubstrat

175 µg/ml BCIP
62,5 µg/ml NBT
in Puffer 3 lösen [frisch]

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

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA

Tabelle 34: Detektion der RNA-Sonden mittels Fluoreszenz-Nachweis

	Behandlung	Lösung	Dauer, Spezifikationen
Tag 2:	Äquilibrierung	TNT	5 min
IHC-Nachweis	Blockieren	TNB	1 h, feuchte Kammer mit 4x SSC
Nachweis mit TSA-Amplifikation	Inkubation	Anti-DIG-POD (Tabelle 1. Primäre Antikörper, Seite 23) in TNB (1 : 250)	1 h, feuchte Kammer mit 4x SSC
	Waschen	TNT	3x 5 min
	Inkubation	<i>Fluorophore Amplification Reagent: Fluorescein-Tyramide</i> in 1x <i>Diluent</i> (1 : 50)	15 min
	Farbsubstrat ablaufen lassen		über Nacht
	Waschen	TNT	3x 5 min
Tag2:	Waschen	1x PBS mit 0,05% TritonX-100	3x 2 min
hrGFP-Antikörper-Färbung (optional)	Blockieren	<i>Dako Antibody Diluent</i>	30 min, feuchte Kammer
	Inkubation	Anti-hrGFP (Tabelle 1. Primäre Antikörper, Seite 23) in <i>Dako Antibody Diluent</i> (1 : 100)	3–4 h bei RT; über Nacht bei 4 °C, feuchte Kammer

Tag 3:	Waschen	1x PBS	kurz
hrGFP- Antikörper- Färbung (optional)	Waschen	1x PBS mit 0,1% TritonX-100	3x 5 min
	Inkubation	Anti- Kaninchen-IgG-Alexa-Fluor 546 (Tabelle 2. Sekundäre Antikörper, Seite 23) in <i>Dako Antibody Diluent</i> (1 : 300)	2 h
	Waschen	1x PBS	kurz
	Waschen	1x PBS mit 0,1% TritonX-100	3x 5 min
	Waschen	1x PBS	5 min
	Inkubation (Kernfärbung)	<i>TO-PRO[®]-3 Iodide (642/661)</i> in 1x PBS (1 : 400)	15 min
	Waschen	1x PBS	5 min
	Tauchen	Wasser	
	Eindecken	<i>Dako Fluorescent Mounting Medium</i>	

TNT (Waschpuffer)

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

0,15 M NaCl

0,05% (v/v) Tween®20

TNB (Blockier-Puffer)

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

0,15 M NaCl

0,5% *Blocking Reagent (Tyramide Signal Amplification Kit)*

[bei -20 °C lagern]

2.2.4.7 Dokumentation und statistische Auswertung

Übersichtsbilder von IHC sowie *ISH* wurden mit dem *Mirax Scan* System aufgenommen. Für die in der Arbeit dargestellten mikroskopischen Abbildungen wurden sowohl Aufnahmen am Mikroskop *Eclipse E 1000* (Durchlicht), als auch mit Hilfe des Konfokalen Mikroskops *Leica TCS SP2* (Fluoreszenz) angefertigt.

Einzelne Geschmacksknospenquerschnitte wurden so ausgezählt, dass sowohl Gesamtzellzahlen, als auch die Anzahl diverser markierter Zellen ermittelt wurden. Dazu wurde für NBT/BCIP-Markierung das Mikroskop *Axioplan* bei 20 - oder 40-facher Vergrößerung genutzt, die Auszählung der am Konfokalen *Laserscanning*-Mikroskop entstandenen Fluoreszenz-Aufnahmen erfolgte unter Nutzung der Software *LCS lite*.

Für die statistische Auswertung wurde in der Software *IBM SPSS Statistics 20* eine einfaktorielle Varianzanalyse (Anova-F-Test) durchgeführt. Um Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten zu prüfen wurde als *Post-Hoc*-Analyse der *Bonferroni*-Test oder der *t*-Test genutzt.

2.2.4.8 Isolation und Darstellung des Zungen- bzw. Gaumenepithels

Für die Isolation von Gesamt-Zungen- bzw. -Gaumenepithel wurde nach Tötung des Tieres (*Isofluran*-Überdosis mit anschließender zervikaler Dislokation) sofort die ganze Zunge bzw. der gesamte Gaumen (Abbildung 7a) entnommen und in *Normal Tyrodes* auf Eis aufbewahrt. Die nächsten Arbeiten wurden unter einem Binokular durchgeführt.

Die Isolation des Zungenepithels erfolgte ähnlich zu den Schilderungen in Abbildung 5 und Abbildung 6 (Seite 41). Dabei wurde zügig insgesamt etwa 1ml Enzymgemisch an mehreren Stellen unter das Zungenepithel injiziert. Wichtig war es dabei, darauf zu achten, dass (1) die Kanüle während der Injektion nirgendwo durch das Epithel tritt, (2) an Stellen, an denen das Epithel dicker ist (z. B. Zungenoberfläche – mittig), mehr Enzymgemisch injiziert wird, als unter das dünnere Epithel und (3) weder die Papillen von der Epithelunterseite, noch das Zungenepithel von der Oberseite her verletzt werden. Dann inkubierte die ganze Zunge etwa 20 Minuten lang in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem *Tyrodes* unter Zufuhr von Luft (Linde, München, D). Anschließend erfolgte, in *Normal Tyrodes* um ein Austrocknen zu verhindern, die Isolation des Epithels vom restlichen Zungengewebe mit Hilfe einer Pinzette, sodass es sauber vom restlichen Zungengewebe getrennt war.

Zur Isolation des weichen Gaumenepithels wurde der Gaumen zunächst mittels Insektennadeln in einer mit *Normal-Tyrodes* gefüllten *SYLGARD*-Petrischale fixiert (Abbildung 7b). Dabei wurde das Gewebe gespannt, um das anschließende Einstechen der Injektionskanüle zu erleichtern. Es wurden ca. 100–150 μl Enzymgemisch unter das Epithel innerhalb der in Abbildung 7b markierten „Schnittorte“ injiziert. Danach inkubierte der Gaumen für etwa zehn Minuten in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem *Tyrodes*. Nach Spülen des Gewebes mit *Normal Tyrodes*, wurde mit einer Präzisions-Präparationsschere am dorsalen Ende des weichen Gaumens von oben ein Einschnitt vorgenommen. Von dort aus erfolgte mit einer Pinzette ein vorsichtiges Abziehen des Epithels in Richtung des harten Gaumens. Dabei musste kurz vor dem harten Gaumen besonders vorsichtig gearbeitet werden, da dort der sogenannte Geschmacksstreifen liegt. Bei einem zu schnellem Abziehen könnte es zum Einreißen des Epithels an dieser Stelle führen. Es wurde bis zur zweiten Vertiefung im harten Gaumen abgezogen und dort abgeschnitten.

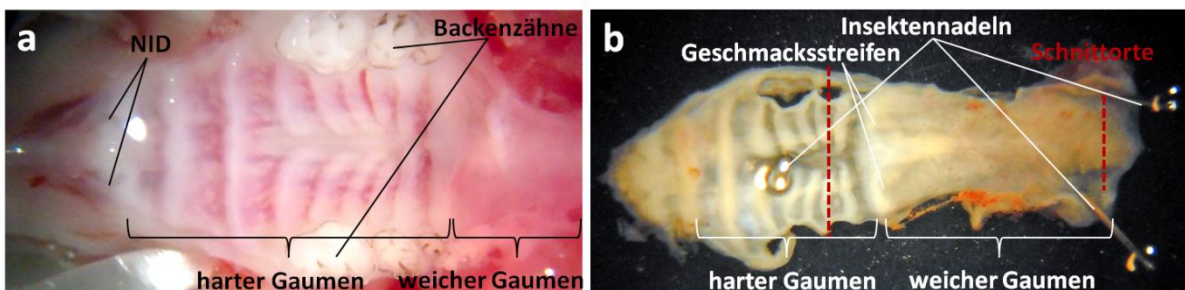


Abbildung 7: Darstellung des Gaumens und dessen Epithelisolierung. a) Gaumen innerhalb der Mundhöhle: Der harte Gaumen liegt hinter dem *Naso-incisor duct* (NID), zwischen den Backenzähnen. Es schließt sich der weiche Gaumen an. b) Isolierter, befestigter Gaumen: Rot-markiert sind die Orte, an denen vor und nach dem Abziehen des Epithels ein- bzw. abgeschnitten wird.

Danach wurde das jeweilige Epithel kurz in *Normal Tyrodes* gespült und anschließend in einer *SYLGARD*-haltigen mit *Normal Tyrodes* gefüllten Petrischale mit Hilfe von Insektennadeln mit der Epithelunterseite nach oben aufgespannt. Mittels einer Präzisions-Präparationsschere mit Federgriffen wurde das Epithel an dessen Rändern gegebenenfalls etwas begradigt. In die Petrischale wurde vorsichtig eiskalte 4%ige PFA-Lösung pipettiert, wo diese zur Fixierung mindestens zehn Minuten verweilte. Das fixierte Gewebe wurde auf einen Objektträger transferiert und mit fluoreszenzschützendem Eindeckmedium (*Dako*) und einem Deckgläschen versehen. Die Aufnahmen des Gesamtzungen- bzw. weichen Gaumen-Epithels erfolgten mittels *Mirax Scan System* (*Zeiss*). Abbildungen wurden erstellt, indem unter der Nutzung der *Adobe Photoshop 7.0.1 software* (*Adobe Systems*) Einzelaufnahmen der verschiedenen Fluoreszenzen in Ebenen übereinander gelegt und bearbeitet wurden.

Enzymmix

8 mg Kollagenase A (0,25 U/mg lyo.)

20 mg *Dispase II (neutral protease, grade II)* (0,99 U/mg lyo.)

20 mg *Trypsin inhibitor, Type I-S: From Soybean*

4 mg *DNase I, from bovine pancreas* (>2000 U/mg) in *Normal Tyrodes*

Normal Tyrodes (pH 7,4)

10 mM NaPyruvat

135 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM CaCl₂

1 mM MgCl₂

10 mM HEPES

10 mM Glucose

5 mM NaHCO₃

Ca²⁺/Mg²⁺-freier Tyrodes (pH 7,4)

140 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM HEPES

10 mM Glucose

10 mM NaPyruvat

2 mM EGTA

2.2.5 Funktionelle Analysen

2.2.5.1 Einzelzell-Calcium-Imaging

2.2.5.1.1 Präparation der Zellen

Für funktionelle Analysen von Bittergeschmacksrezeptorzellen wurde zunächst das Wallpapillen-haltige Zungenepithel, wie innerhalb 2.2.3.1 „Gewebeentnahme zum Nachweis von mRNA mittels RT-PCR“ auf Seite 40 bereits beschrieben, isoliert. Danach wurde dieses für zwei Minuten in *Normal Tyrodes* gespült. Es folgte eine erneute Inkubation in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem *Tyrodes*. Nach wiederholtem zweiminütigem Spülen in *Normal Tyrodes* wurde das Epithelstückchen mit den Geschmacksknospen-enthaltenden Gräben nach oben zeigend in einer geschwärzten SYLGARD-haltigen Petrischale mit Minutiennadeln aufgespannt (Abbildung 8a), um dort für drei Minuten in einer 0,5 mg/ml DNase I-enthaltenden *Normal Tyrodes*-Lösung zu verweilen. Nach diesem Inkubationsschritt wurde die Lösung abgesaugt und die Petrischale mit *Normal Tyrodes* aufgefüllt. Um zu verhindern, dass Geschmacksknospen oder Zellen darin kleben bleiben, wurde eine Glaskanüle durch Auf- und Abpipettieren mit 0,2%igem PVP in *Normal Tyrodes* beschichtet. Eine solche Glaskanüle mit einer Öffnung von ca. 80 μm Durchmesser diente anschließend, um entlang der Gräben (roter Pfeil – Abbildung 8b) Geschmacksknospen aufzusaugen. Um einzelne Zellen zu erhalten, diente eine Glaskanüle mit einer Öffnung von etwa 20–30 μm . Dabei konnten die Zellen durch Auf- und Abtrieren mechanisch weiter vereinzelt werden. Einzelzellen oder Geschmacksknospen wurden in eine vorbereitete, mit *BD Cell-Tak™* beschichtete *Recording/Perfusion Chamber RC-25* exspiriert (Abbildung 8c – zwei Kammern und Deckgläschen).

Darin erfolgte eine Beladung der Zellen für ca. 40 Minuten mit 5 μm Fura-Farbstoff (siehe Tabelle 3) in Fura-Ladepuffer bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach dem Beladen wurde der Ladepuffer wieder entfernt und die *Recording/Perfusion Chamber RC-25* mit *Normal Tyrodes* gefüllt. Die Zellen ruhten zunächst ca. 20 Minuten bei Raumtemperatur, bevor sie mit Substanzen stimuliert wurden. Zusätzlich vorbereitete Kammern wurden zunächst bei 4 °C gelagert.

Enzymgemisch

8 mg Kollagenase A (0,25 U/mg lyo.)

20 mg *Dispase II (neutral protease, grade II)* (0,99 U/mg lyo.)

20 mg *Trypsin inhibitor, Type I-S: From Soybean*

4 mg *DNase I, from bovine pancreas* (>2000 U/mg) in *Normal Tyrodes*

Normal Tyrodes (pH 7,4)

10 mM NaPyruvat

135 mM NaCl

5 mM KCl

2 mM CaCl_2

1 mM MgCl_2

10 mM HEPES

10 mM Glucose

5 mM NaHCO_3

$\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freier Tyrodes (pH 7,4)

140 mM NaCl

5 mM KCl

10 mM HEPES

10 mM Glucose

10 mM NaPyruvat

2 mM BAPTA

Fura-Ladepuffer

0,1% Bovines Serum Albumin (*w/v*) in *Normal Tyrodes*

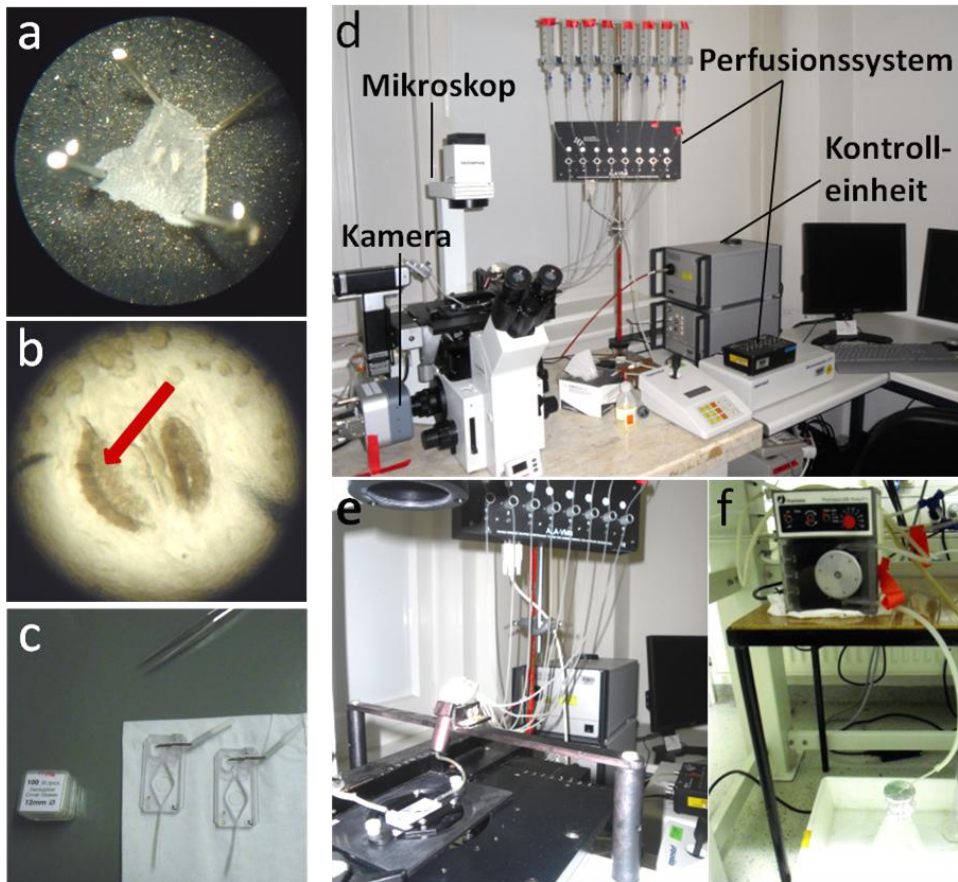


Abbildung 8: Darstellungen zur Einzelzell-Präparation und zum Einzelzell-Imaging. a) aufgespanntes Wallpapillen-Epithel; b) Wallpapillen-Gräben mit Geschmacksknospen; c) zwei *Recording/Perfusion Chambers RC-25*, sowie Deckgläschen; d) gesamtes *Imaging-System* mit Mikroskop, Kamera, Rechner- und Kontrolleinheit; e) Trägertisch mit Kammer und Schlauchverbindungen; f) Peristaltik-Pumpe mit Abflussbehälter.

2.2.5.1.2 Das Perfusionssystem

Die Stimulation der Zellen erfolgte, indem die *Recording/Perfusion Chamber RC-25* auf einen Trägertisch eines Mikroskops *Olympus IX50* eingespannt wurde (Abbildung 8e). An der Kammer wurde ein Schlauch für die Perfusion, an welchem eine gravitationsgetriebene Perfusionsapparatur (*BPS-8 Valve Control System + ALA-VM-8*) verbunden war, angebracht. Außerdem wurde zum Absaugen ein weiterer Schlauch befestigt, dessen Ende in eine Peristaltik-Pumpe (Abbildung 8f) eingespannt war. Innerhalb dieses Perfusionssystems entstand während der Messung eine Flussrate von 0,7–0,85 ml/min. Die Zellen wurden in der Kammer ständig mit *Normal Tyrodes* umspült, zur Stimulation wurde das Perfusionssystem (Abbildung 8d) umgeschaltet, sodass eine Substanz in die Kammer fließen konnte. Nach Umschalten dauerte es ca. 30–40 Sekunden, bis die Substanz zu den Zellen in der Kammer gelangte, die Dauer der Stimulation selbst betrug 40 Sekunden, und nach etwa zwei bis drei Minuten nach Zurückschalten zu *Normal Tyrodes* war die Substanz wieder aus der Kammer ausgewaschen.

2.2.5.1.3 Das Imaging-System und die Messung

Das System besteht aus einem inversen Mikroskop *Olympus IX50* (Abbildung 8a), in das verschiedene Fluoreszenzfilter-Sets (siehe Tabelle 17, Seite 36) eingebaut sind und an welchem eine hochauflösende digital-monochrome CCD Kamera (Abbildung 8a), *Andor Clara E*, angebracht ist. Gesteuert wird das System über eine Rechneinheit mit Kontrolleinheit, *Realtime TILL Imaging*, welche mit der Monochromator-basierten Beleuchtungseinheit zur Fluoreszenzanregung, *Polychrome V*, verbunden ist. Diese leitet über einen Lichtleiter die entsprechenden Fluoreszenzanregungen weiter.

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktion der Zellen wurde innerhalb des *Imaging*-Systems über eine Calcium-abhängige Fluoreszenzänderung des entsprechenden *Fura*-Farbstoffes (Ca^{2+} -bindend) gemessen. So erfolgte automatisiert mittels der *Live Acquisition Software v.2.1.0* eine Anregung der *Recording/Perfusion Chamber RC-25* alle fünf Sekunden mit einer Belichtungszeit von 20–25 Millisekunden und mit der/den spezifischen Anregungswellenlänge/n für den Farbstoff. Dabei wurde durch eine 40-faches Öl-Immersionsobjektiv sowohl eine Bildaufnahme gemacht, als auch die Fluoreszenzänderung über die Zeit gemessen und in einem Plot aufgetragen. Während der Messung wurde vor jeder Stimulation mindestens 100 Sekunden lang eine Basislinie aufgezeichnet. Nach der Messung erfolgte eine manuelle Auswertung der Daten, indem die Werte der Fluoreszenzänderung über die Zeit in *Microsoft Excel 2010* exportiert und bearbeitet wurden (siehe „Auswertung der erhaltenen Kurven“).

Stimuli:

KCl (pH 7,4)

10 mM Natriumpyruvat
90 mM NaCl
50 mM KCl
2 mM CaCl_2
1 mM MgCl_2
10 mM HEPES
10 mM Glucose
5 mM NaHCO_3

ATP

10-100 μM ATP in *Normal Tyrodes*

Papaverin

200 μM in *Normal Tyrodes*

Denatoniumbenzoat

1 mM in *Normal Tyrodes*

PROP

500 μM in *Normal Tyrodes*

Cycloheximid

30 μM in *Normal Tyrodes*

Bitter-Mix

alle Bittersubstanzen in *Normal Tyrodes*

2.2.5.1.4 Auswertung der erhaltenen Kurven

Nachdem die Werte der Fluoreszenzänderung über die Zeit exportiert worden waren, wurden $\Delta F/F$ -Werte berechnet:

$$\Delta F/F = (F_{\max} - F_0)/F_0.$$

F_{\max} = Maximum der Fluoreszenz nach Stimulation

F_0 = Basislinie = Mittelwert aller Einzelwerte 100 Sekunden vor Stimulation

Als **Reaktion** einer Zelle wurde beurteilt, wenn: (1) $\Delta F/F$ mindestens zweimal so groß wie die Basislinien-Fluktuation war, (2) der Anstieg von Ca^{2+} transient war und (3) das Maximum des Anstieges spätestens 200 Sekunden nach der Stimulation erreicht war.

Als **keine Reaktion** einer Zelle auf einen Stimulus wurde beurteilt, wenn: (1) die gerade beschriebenen Kriterien nicht erfüllt waren, jedoch (2) dieselbe Zelle danach auf einen anderen Stimulus reagierte.

Die Graphen der Kurvenverläufe wurden in *Sigma Plot 11.0* generiert.

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zunächst Untersuchungen zur Charakterisierung von in der Abteilung Molekulare Genetik des *DIfE* durch Dr. Anja Voigt neu generierten, genetisch modifizierten Mauslinien (siehe 2.1.10, Seite 32). Sie beinhalten sowohl Analysen von Expressionsorten im extragustatorischen Bereich, als auch die zelluläre Untersuchung von gustatorischen Expressionsorten anhand des Fluoreszenzreporters hrGFP (Tas2r131^{BLiG/BLiG}- und Tas2r131^{BLiG/BLiG}/ Tas1r1^{BLiR/BLiR}-Mauslinien).

Die im Locus des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r131 genetisch veränderten Mäuse werden danach für Analysen zu den molekularen Grundlagen der Bittergeschmacks-wahrnehmung in der Mundhöhle genutzt. So werden hier zahlreiche Expressionsana-lysen gezeigt, welche dazu dienen zum ersten Mal die Ko-Expression der Tas2r in einzel-nen Geschmacksrezeptorzellen von Mäusen detailliert zu beschreiben. Dazu wird zunächst die Expression aller 35 bisher als funktionell identifizierten Bitterrezeptoren in C57BL/6-Maus-Geschmackspapillen überprüft. Anschließend folgen Ergebnisse zur Analyse der Tas2r131 exprimierenden Zellpopulation in Wall- und Blätterpapillen von Tas2r131^{BLiG}-Mäusen, sowie zu Ko-Expressionsstudien dieses Rezeptors mit α -Gust-ducin und anderen Tas2r. Auch wird die Tas2r131-Ko-Expression mit allen anderen Bitterrezeptoren in Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) gezeigt. Darüber hinaus werden, im Hinblick auf die Erkundung einer möglichen Bitter-Unterscheidung, isolierte Bittergeschmacksrezeptorzellen von Tas2r131^{BLiG}-Mäusen für einige bekannte Bitterstoffe funktionell charakterisiert.

3.1 Expressionsorte von Maus-Bitterrezeptoren

Zur Aufklärung von nichtgustatorischen Tas2r-Expressionsorten, wurden zuerst extra-orale Gewebe und Organe auf die Expression von Tas2r131 überprüft. Diese Unter-suchungen dienten vor allem der Beschreibung von im Tas2r131-Locus modifizierten Mauslinien (2.1.10, Seite 32), auch, um den möglichen Einfluss eines Tas2r131-*Knock-outs* auf weitere Analysen einschätzen zu können. Einige aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Expression von Tas2r131 in extragustatorischen Organen und das Aufzeigen der Möglichkeiten diesen Rezeptor im Gewebe visualisieren zu können, verbunden mit der Möglichkeit des genetischen *Knock-outs* von Tas2r131, führten zu diversen Kooperationen. Diese bestanden sowohl innerhalb der Abteilung Molekulare Genetik des *DIfE*, als auch mit externen Wissenschaftlern (z. B. Publikationen: Artikel – Abteilung Molekulare Genetik, Artikel – Kooperationen, Seite VII).

Im Rahmen der Untersuchung von gustatorischen Expressionsorten der Bitterrezep-toren wurde in Mäusen mit gezielt genetisch verändertem Geschmacksrezeptorlocus die Verteilung von Tas2r131 im Vergleich zu Tas1r1 exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenzreportern in den Geschmackspapillen des Zungen- sowie Gaumenepithels

visualisiert. Außerdem wurde die Expression aller 35 als funktionell charakterisierten Tas2r auf mRNA-Ebene in VP+FoP-Epithel von C57BL/6-Mäusen untersucht.

3.1.1 Nachweis von Tas2r-mRNA in Maus-Geweben

Zunächst erfolgte mittels Gewebe-Screening eine Untersuchung der mRNA-Expressionsorte von Tas2r131 im Vergleich zu Tas2r108, ein Rezeptor, für welchen, begründet auf vergangenen Studien, ein eher weiteres Expressionsspektrum vermutet werden kann (z. B. Finger, Bottger *et al.* 2003 und eigene Befunde). Dazu wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben, Organen oder Organabschnitten (siehe Abbildung 9) von C57BL/6-Mäusen gewonnen. Aus diesen wurde anschließend cDNA generiert (siehe 2.2.3.3, Seite 42), welche wiederum als Matrize (getestet je 1 und 2 µl aus cDNA-Lösung) in RT-PCRs eingesetzt wurde. Zur Kontrolle, ob die generierte cDNA intakt war und ob keine genomische DNA in den Proben enthalten war, wurde zunächst eine PCR durchgeführt, in der ein Sequenzabschnitt des *Housekeeping*-Gens, β -Aktin (siehe Tabelle 9), nachgewiesen werden sollte. Nur, wenn diese Sequenz in der +RT-Probe gut nachweisbar war und in der -RT-Probe keine β -Aktin-DNA detektiert wurde, kam die cDNA für die Analyse der mRNA-Expression der Intron-freien *Tas2r*-Gensequenzen zum Einsatz.

In der oberen Reihe von Abbildung 9 sind exemplarisch die Ergebnisse einer solchen PCR dargestellt. Es wird deutlich, dass nur unter Nutzung der +RT-cDNA als Matrize für alle Organe eine eindeutige Bande für β -Aktin zu erkennen ist, d. h. dessen mRNA in allen untersuchten Geweben nachweisbar ist. Außerdem sind keine Banden für PCR-Produkte aus den -RT-cDNA-Proben zu erkennen.

Alle Expressionsanalysen erfolgten für mindestens zwei verschiedene Tiere pro Gewebe, Organ bzw. Organabschnitt. Als positives Ergebnis, d. h., dass die gesuchte Rezeptorsequenz im untersuchten Gewebe exprimiert ist, galt, wenn im entsprechenden Organ eine Expression in mindestens zwei unabhängigen Tieren nachweisbar war. Wenn dies der Fall war, sind in Abbildung 9 exemplarisch PCR-Banden im Übersichtsbild dargestellt.

Demzufolge ist Tas2r108-mRNA in allen untersuchten Geweben nachweisbar. Dabei ist hervorzuheben, dass die PCR-Bande für den Nachweis der Tas2r108-mRNA-Expression in Blut deutlich schwächer ausfällt, als die Banden anderer Gewebe.

Tas2r131-mRNA-Expression kann in folgenden gustatorischen Organen detektiert werden: in mit Pilz-, Blätter-, oder Wallpapillen angereichertem Zungengewebe, NID, und im weichen Gaumen. Auch in olfaktorischen Geweben, wie Nasenepithel und Vomeronasalorgan, ist Tas2r131-mRNA nachweisbar. Außerdem kann eine Tas2r131-mRNA-Expression in dem Geschmacksknospen-enthaltenden Kehldeckel, in verschiedenen Hirnregionen, wie Cortex, Hypothalamus und Riechkolben, und im *Ganglion geniculatum* (GG) gezeigt werden. Auch der Thymus, als lymphatisches Organ, weist Tas2r131-mRNA-Expression auf. Außerdem kann Tas2r131-mRNA in den männlichen reproduktiven Organen, Hoden und Nebenhodenkopf, nachgewiesen werden.

3 Ergebnisse

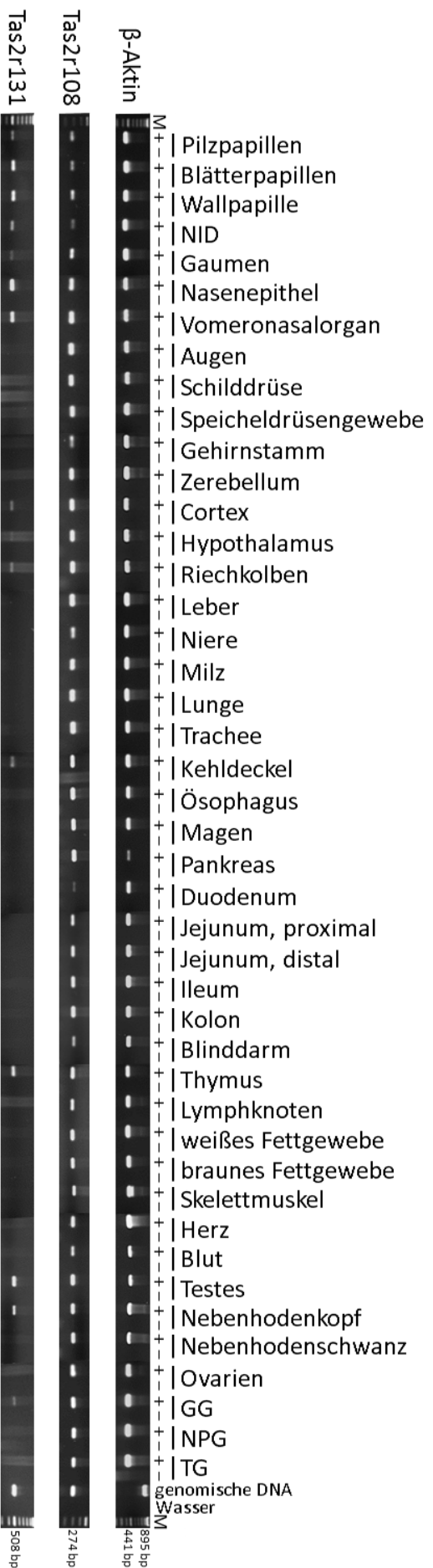


Abbildung 9: Expression von Tas2r108 und Tas2r131 in diversen Geweben. Unter Verwendung von cDNA als Matrize wurde, nachdem die Expression von β -Aktin kontrolliert worden war, die mRNA-Expression von Tas2r108 und Tas2r131 in diversen Geweben untersucht. Dazu wurden in Endpunkt-RT-PCRs (40 Zyklen) Gewebe von mind. zwei unabhängigen Tieren analysiert. Die repräsentativ zusammengestellten Agarosegel-Bilder zeigen deutlich, dass zunächst β -Aktin-mRNA eindeutig in allen Geweben nachweisbar ist. Auch eine Tas2r108-mRNA-Expression kann in allen untersuchten Geweben gezeigt werden. Hingegen ist Tas2r131-mRNA nur in ausgewählten Geweben nachweisbar: Neben gustatorischen Organen (Zungengewebe, welches Pilz-, Blätter-, oder Wallpapillen enthält; NID; Gaumen) exprimieren auch olfaktorische Gewebe (Nasenepithel, Vomeronasalorgan), der Geschmacksknospen-enhaltende Kehldeckel, Thymus, reproduktive Organe (Testes und Nebenhodenkopf), Gehirnareale (Cortex, Hypothalamus und Riechkolben) sowie das *Ganglion geniculatum* nachweisbar Tas2r131-mRNA. M = Marker (*GeneRuler™* DNA Ladder Mix).

Pilzpapillen (Zungenspitze), Blätterpapillen (ausgestanzt), Wallpapille (ausgestanzt), NID = englisch *naso-incisor duct* (Gang zwischen Nasenhöhle und Gaumen), Gaumen (hauptsächlich weicher Gaumen), Nasenepithel (ausgeschabt), Niere (linke), Lunge (linker Flügel), Lymphknoten (mesenterial), weißes Fettgewebe (gonadal), Skelettmuskel (linker Oberschenkel), GG = *Ganglion geniculatum*, NPG = *Ganglion nodosum/petrosum*, TG = Trigeminalganglion

3.1.2 Visualisierung von Tas2r131 exprimierenden Zellen

Im Folgenden wurden alle Gewebe näher betrachtet, die in den Endpunkt-RT-PCRs als Tas2r131-mRNA exprimierend identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 9; NID, Gaumen, Kehldeckel, Hirn und Ganglien - siehe Voigt 2011; Voigt, Hübner *et al.* 2012). Dazu wurde in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Maus-Geweben nach Eigenfluoreszenz des Reporters hrGFP gesucht. Die verwendeten Tiere wurden dafür, wie in 2.2.4.1 auf Seite 49 beschrieben, perfundiert, die zu untersuchenden Gewebe oder Organe präpariert und 14 µm dicke Gefriergewebeschnitte angefertigt (2.2.4.2, Seite 49).

In der vorliegenden Arbeit werden nun folgend hrGFP-positive nichtgustatorische Gewebeausschnitte sowie exemplarische Abbildungen von Zungen- bzw. Gaumenepithelien gezeigt.

Dabei wird die Umamirezeptor-Untereinheit, Tas1r1, herangezogen, um deren Verteilung als Rezeptor(-Untereinheit) von unterschiedlicher Geschmacksqualität, der Verteilung des Bitterrezeptors, Tas2r131, in den gustatorischen Geweben gegenüberzustellen. Dazu werden die Fluoreszenzen des Tas2r131-Reporters, hrGFP, und des Tas1r1-Reporters, mCherry, dargestellt (siehe Abbildung 11 und Abbildung 13, ab Seite 70).

3.1.2.1 Nichtgustatorische Maus-Gewebe

Innerhalb der nichtgustatorischen Gewebe gelang es, hrGFP-positive Zellen in VNO, Nasenepithel, den reproduktiven Organen und im Thymus zu identifizieren (Abbildung 10). Auch weitere Organe, wie Augen, Gehirn, Lymphknoten, Trachea, Lunge, Leber, Niere, Milz, weißes und braunes Fettgewebe, Skelettmuskel, Blut und Ovarien wurden während dieser Arbeit auf Gegenwart des Tas2r131-Reporters untersucht. Jedoch ist in diesen Geweben keine spezifische hrGFP-Fluoreszenz detektierbar.

In Abbildung 10 sind dementsprechend alle extragustatorischen Gewebe dargestellt, die eine spezifische Fluoreszenz für den Tas2r131-Reporter, hrGFP, aufzeigen. Betrachtet man die murine Nase, findet man einzelne hrGFP-positive Zellen im Vomeronasalorgan (VNO) und im Nasenepithel. Innerhalb der männlichen reproduktiven Organe der Maus ist hrGFP-Fluoreszenz in Hoden und Nebenhoden-Abschnitten visualisierbar. Dabei sind in den Samenkanälchen der Hoden unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale sichtbar, deren Intensität mit höherer Entwicklung der Spermatozoen-Vorläufer-Zellen zunimmt (von außen nach innen). Im Nebenhoden taucht hrGFP-Fluoreszenz nur im Lumen der Samenkanälchen auf. In isolierten Spermatozoen ist hrGFP hauptsächlich im Mittelstück dessen Schwanzes akkumuliert. Im Gegensatz zu männlichen Mäusen, konnte in den weiblichen reproduktiven Organen, wie den Ovarien, keine hrGFP-Fluoreszenz beobachtet werden.

3 Ergebnisse

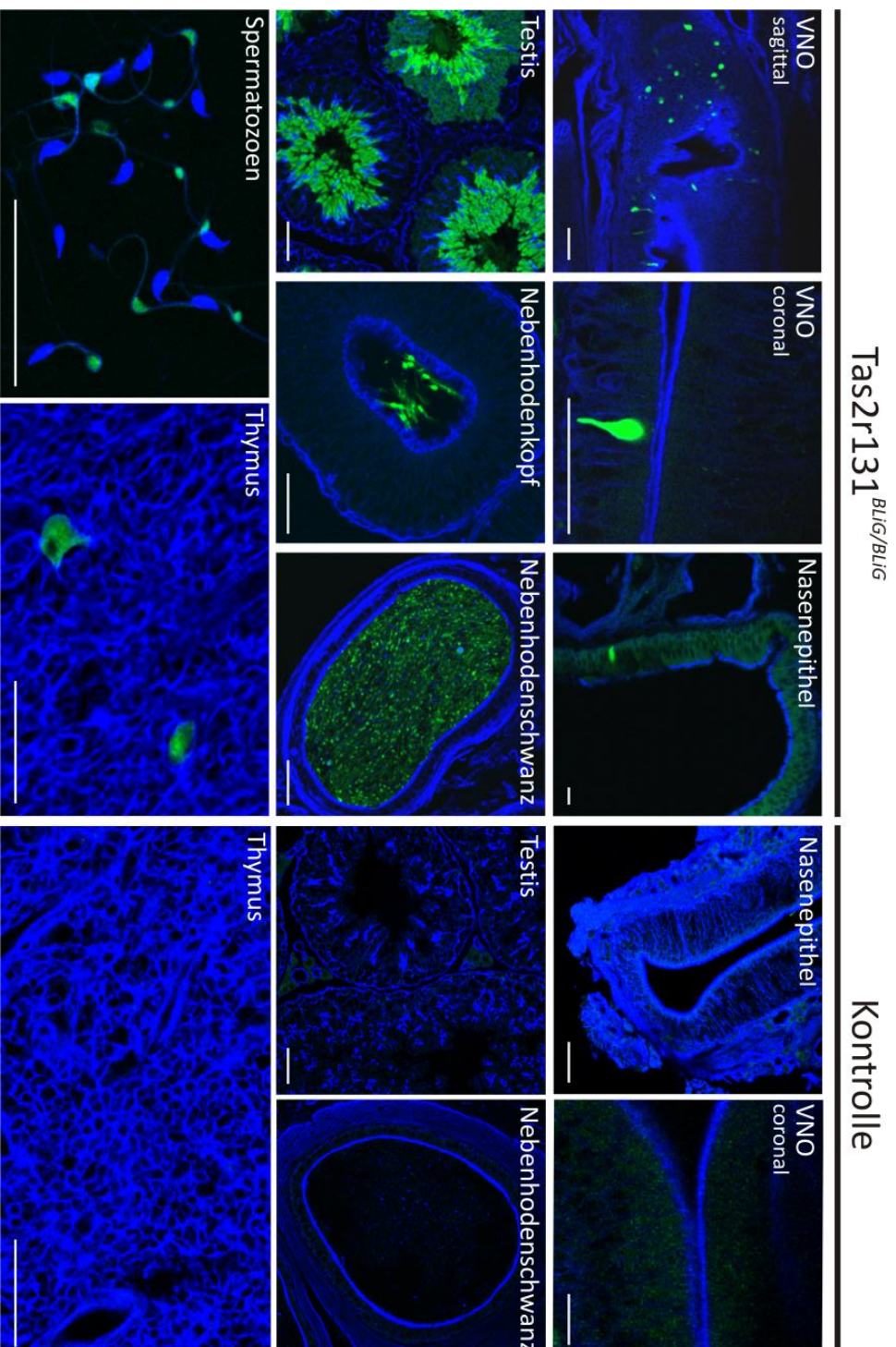


Abbildung 10: Expression des Tas2r131-Reporters, hrgFP, in nichtgustatorischen Geweben. Gezeigt sind exemplarische Ausschnitte aller untersuchten Gewebe, in denen es gelang, eindeutig eine Eigenfluoreszenz des hrgFPs in Tas2r131^{BlüG/BlüG}-Tieren nachzuweisen. Dargestellt sind Ausschnitte aus dem Vomeronasalorgan (VNO), dem Nasenepithel, Testis, Nebenhodenkopf und -schwanz, Spermatozoen und Thymus. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Tiere, die keine hrgFP-Expression unter Kontrolle des Tas2r131-Promoters aufweisen. Dabei ist die Fluoreszenz von hrgFP (grün) und die Gewebestruktur mittels Phalloidin-Färbung (VNO, Nasenepithel, Nebenhodenkopf und -schwanz) oder TOPRO-Färbung (Spermatozoen) (blau) dargestellt. Alle Maßstäbe: 50 µm (ähnliche Abbildung publiziert in Voigt, Hübner *et al.* 2012)

3.1.2.2 Zungenepithel

Im Zuge der Charakterisierung der $Tas2r131^{BLiG/BLiG}$ -, sowie der $Tas1r1^{BLiR/BLiR}$ -Mäuse, wurden diese zwei Stämme verpaart, sodass beide genetisch modifizierten Geschmacksrezeptorloci in einer Maus homozygot vorlagen. Die Verteilung der jeweiligen Fluoreszenzreporter, hrGFP und mCherry, wurde im isolierten, Geschmackspapillen-enthaltenen Zungenepithel einer solchen Maus untersucht (Abbildung 11).

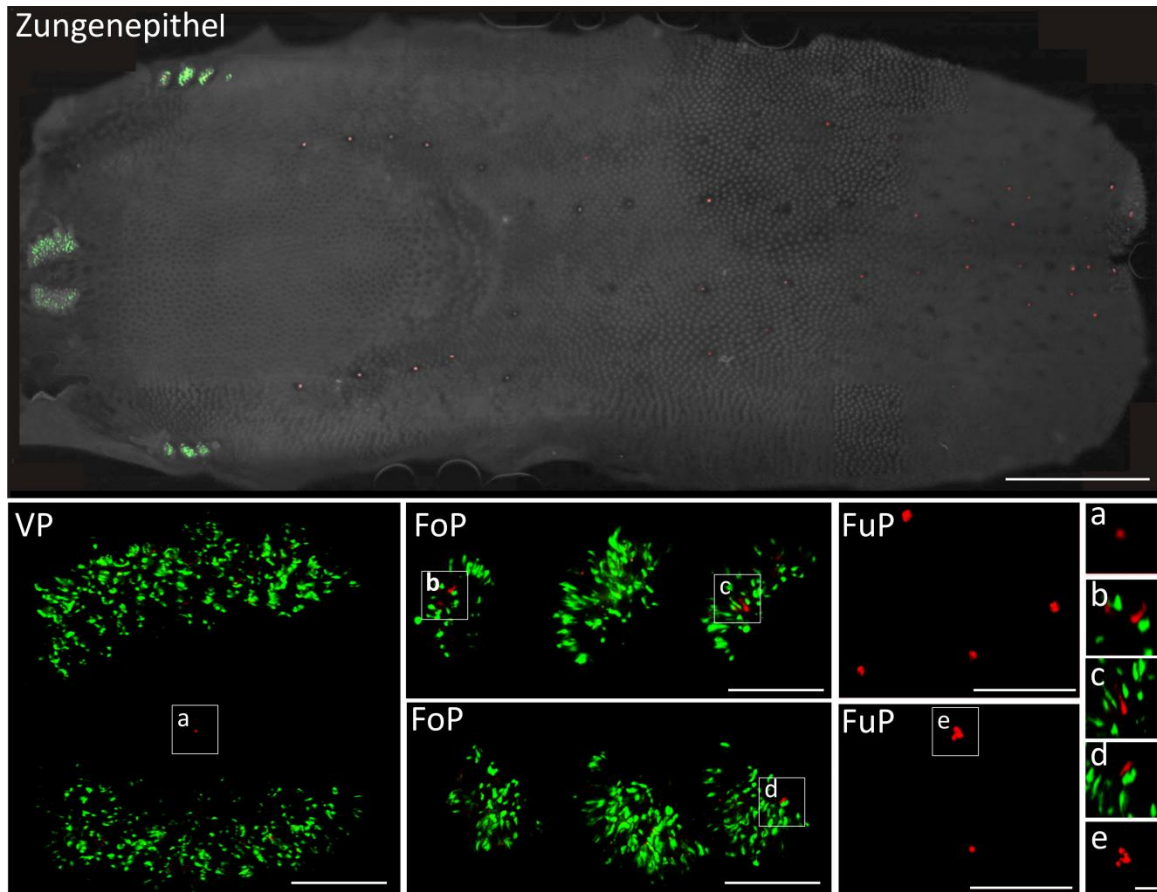


Abbildung 11: Verteilung des $Tas2r131$ -Reporterproteins, hrGFP, im Vergleich zum $Tas1r1$ -Reporterprotein, mCherry, in Zungenepithel von gezielt doppelt-genetisch veränderten Mäusen ($Tas2r131^{BLiG/BLiG}/Tas1r1^{BLiR/BLiR}$). Im oberen Bild ist eine Übersicht des Zungenepithels zu sehen. Maßstab: 2 mm. Untere Bildabschnitte: Ausschnittvergrößerungen von Wallpapille (VP), Blätterpapillen (FoP) und Pilzpapillen (FuP) – Maßstab jeweils 200 µm; sowie detaillierte Ausschnittvergrößerungen in a, b, c, d, und e – Maßstab: 20 µm. (ähnliche Abbildung publiziert in Voigt, Hübner *et al.* 2012)

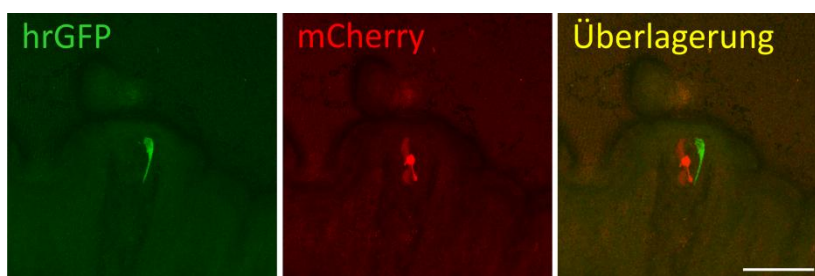


Abbildung 12: Darstellung einer einzelnen Pilzpapille mit $Tas2r131$ -Reporterprotein, hrGFP, und $Tas1r1$ -Reporterprotein, mCherry, in Zungenepithel von gezielt doppelt-genetisch veränderten Mäusen ($Tas2r131^{BLiG/BLiG}/Tas1r1^{BLiR/BLiR}$). Maßstab: 50 µm.

Dabei wurde zunächst ein Übersichtsbild mit Hilfe des *Mirax Scan*-Systems erstellt (oberes Bild, Abbildung 11). Daran sieht man deutlich eine bestimmte Verteilung der beiden unterschiedlichen Fluoreszenzreporter, hrGFP und mCherry. Der Tas2r131-Bitterrezeptor-Reporter, hrGFP, ist hauptsächlich in Wall- und Blätterpapillen (VP und FoP) zu finden. Dagegen sind nur vereinzelt stark rot-fluoreszierende Zellen, die eine Tas1r1-Expression dokumentieren, in diesen Papillen-Typen zu erkennen (Ausschnittvergrößerungen a-d, Abbildung 11). In Pilzpapillen (FuP) ist überwiegend der Tas1r1-Reporter, mCherry, sichtbar (Ausschnittvergrößerung e -Abbildung 11). Dort sind jedoch, wie eine Aufnahme mittels Konfokalem Mikroskop zeigt, mitunter auch hrGFP-positive Zellen vorhanden (Bsp. in Abbildung 12).

3.1.2.3 Gaumenepithel

Die Verteilung der jeweiligen Fluoreszenzreporter, hrGFP und mCherry, wurde außerdem in einem isolierten, Geschmackspapillen-enthaltenden Gaumenepithel einer Tas2r131^{BLiG/BLiG} / Tas1r1^{BLiR/BLiR}-Maus visualisiert (Abbildung 13).

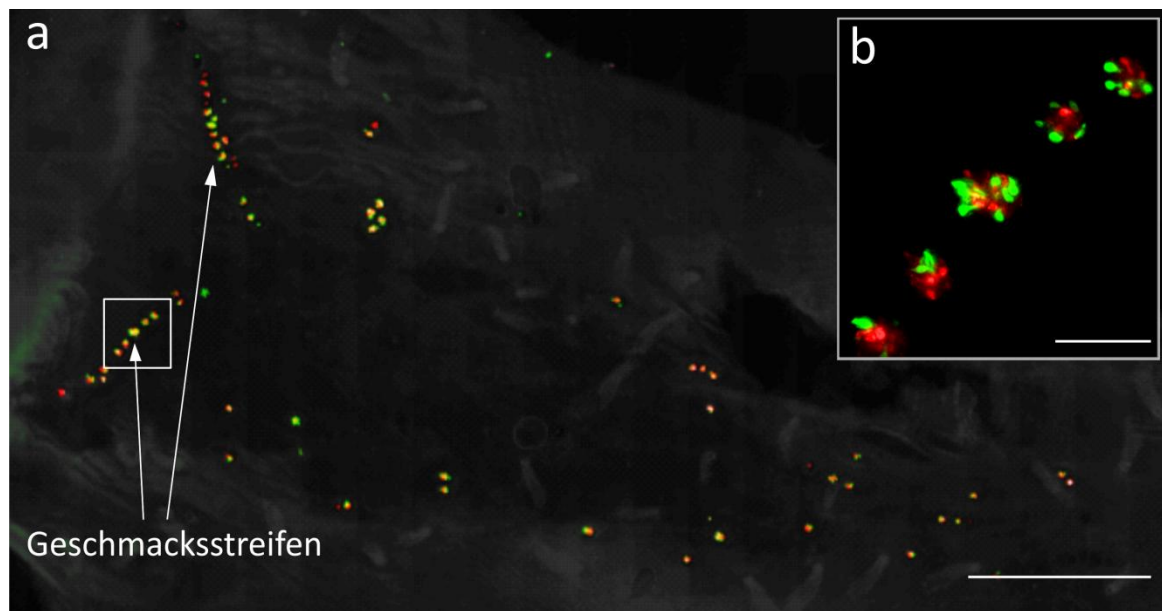


Abbildung 13: Verteilung des Tas2r131-Reporterproteins, hrGFP, im Vergleich zum Tas1r1-Reporterprotein, mCherry, im Epithel des weichen Gaumens von doppelt-genetisch veränderten Mäusen (Tas2r131^{BLiG/BLiG} / Tas1r1^{BLiR/BLiR}). Dargestellt ist ein Übersichtsbild des weichen Gaumenepithels (a), wobei sich auf der linken Seite der Geschmacksstreifen befindet. Maßstab: 1 mm. Außerdem ist eine Ausschnittvergrößerung (b) aus dem Bereich des Geschmacksstreifens abgebildet. Maßstab: 50 µm. (ähnliche Abbildung publiziert in Voigt, Hübner *et al.* 2012)

Es wird deutlich, dass, im Gegensatz zur Verteilung von hrGFP und mCherry in Geschmackspapillen der Zunge, im Gaumenepithel beide Fluoreszenzproteine in allen Papillen vorkommen. D. h., Geschmacksknospen, sowohl in der Region des Geschmacksstreifens (siehe Ausschnittvergrößerung - Abbildung 13), als auch die einzelnen Geschmacksknospen im hinteren Gaumen, enthalten Tas2r131-Reporter exprimierende Zellen und ebenfalls Tas1r1-Reporter exprimierende Zellen.

3.1.3 Bitterrezeptor-Expression in Zungenpapillen

Eine wichtige Frage, die zuvor noch nicht eingehend untersucht wurde, ist, ob alle 35 als funktionell beschriebenen murinen Tas2r-Gene auch in den Geschmacksrezeptorzellen der Zungenpapillen exprimiert werden. Wie bisher in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (3.1.2.2, Seite 70), ist der Reporter für den Bitterrezeptor Tas2r131, hrGFP, hauptsächlich in Geschmacksknospen der Wall- und Blätterpapillen, weniger häufig aber in Knospen von Pilzpapillen zu finden. Deshalb wurden alle 35 als funktionell beschriebenen murinen Bittergeschmacksrezeptoren auf deren mRNA-Expression in Wall- und Blätterpapillen von C57BL/6-Mäusen untersucht.

3.1.3.1 Quantitative mRNA-Analyse der Tas2r in Zungengewebe und Blut

Für quantitative mRNA-Expressionsanalysen wurden *TaqMan-Assays* (Tabelle 11, Seite 28, oder Tabelle 12, Seite 31) in *Real-Time-PCR*-Reaktionen benutzt.

Um eine Vergleichbarkeit der Daten in der dabei angewandten relativen Bestimmung der Expression zu gewährleisten, musste zunächst eine Effizienz-Bestimmung aller PCR-Reaktionen durchgeführt werden (siehe 2.2.3.5, Seite 45). Bei einer sehr niedrigen Effizienz ($\leq 85\%$) wurde ein neuer Assay entworfen oder kommerziell neu erworben. Auch wurden aus der quantitativen Analyse erhaltene PCR-Produkte wie in Abbildung 15 auf 3,5%ige Agarosegele aufgetragen und daraus isoliert, um sie nach Klonierung exemplarisch zu sequenzieren und damit die Spezifität der Expressionsnachweise zu bestätigen (siehe 2.2.3.5, Seite 47). Die Ergebnisse der PCR-Effizienz unter Verwendung der in dieser Arbeit genutzten *TaqMan-Assays* und der Sequenz-Identität von erhaltenen PCR-Produkten zu den gesuchten Sequenzabschnitten sind im Anhang (Tabelle 42, Seite 161) beschrieben.

3.1.3.1.1 Untersuchung der mRNA-Level aller Tas2r in Zungengewebe von C57BL/6-Mäusen

Für die spätere Untersuchung der Bittergeschmacksrezeptor-Ko-Expression in Geschmacksrezeptorzellen wurde zunächst ein Expressionsprofil für alle Tas2r-, Tas1r-mRNA und mRNA weiterer geschmacksassoziierter Gene (NTPDase2, α -Gustducin und Snap25) in Papillengewebe von C57BL/6-Mäusen erstellt. Dazu wurde mit Wall- und Blätterpapillen angereichertes (VP+FoP) Zungenepithel dieser Tiere verwendet. Zur Bestimmung der relativen Expression zu β -Aktin ($2^{-\Delta C_T}$) wurden dabei die Mittelwerte aus vier Mäusen gebildet (Abbildung 14 und Tabelle 35).

Es wird deutlich, dass alle Bitterrezeptoren mit unterschiedlichen mRNA-Expressionsleveln im VP+FoP-Zungenepithel zu finden sind, wobei Tas2r137, Tas2r108, Tas2r135, Tas2r126 und Tas2r118 am stärksten (0,0105–0,0075) und Tas2r114 (0,0001) und Tas2r140 (0,0002) am schwächsten exprimiert sind (Tabelle 35). Auch können in diesem Gewebe alle Tas1r-mRNA-Sequenzen nachgewiesen werden, von denen das höchste mRNA-Expressionslevel von der spezifischen Süßrezeptor-Untereinheit, Tas1r2 (0,0168), erreicht wird und das niedrigste von der spezifischen Umamirezeptor-Untereinheit, Tas1r1 (0,0008). Das Expressionsniveau von Tas1r3 liegt mit dem mittleren

3 Ergebnisse

$2^{-\Delta CT}$ -Wert von 0,0091 im Bereich der am stärksten exprimierten Bittergeschmacksrezeptor-mRNA-Sequenzen. Innerhalb der untersuchten Geschmacks-Epithelien ist die mRNA-Expression von NTPDase2, einem Marker für die Glia-ähnlichen Typ I-Zellen, mit einem $2^{-\Delta CT}$ -Wert von 0,1011 im Mittel etwa zehnfach höher, als die aller Geschmacksrezeptoren im Durchschnitt. Für α -Gustducin, einem Marker für Typ II-Geschmacksrezeptorzellen, liegt die mRNA-Expression bei 0,0488, etwa fünffach höher, als das durchschnittliche mRNA-Expressionslevel aller Geschmacksrezeptoren.

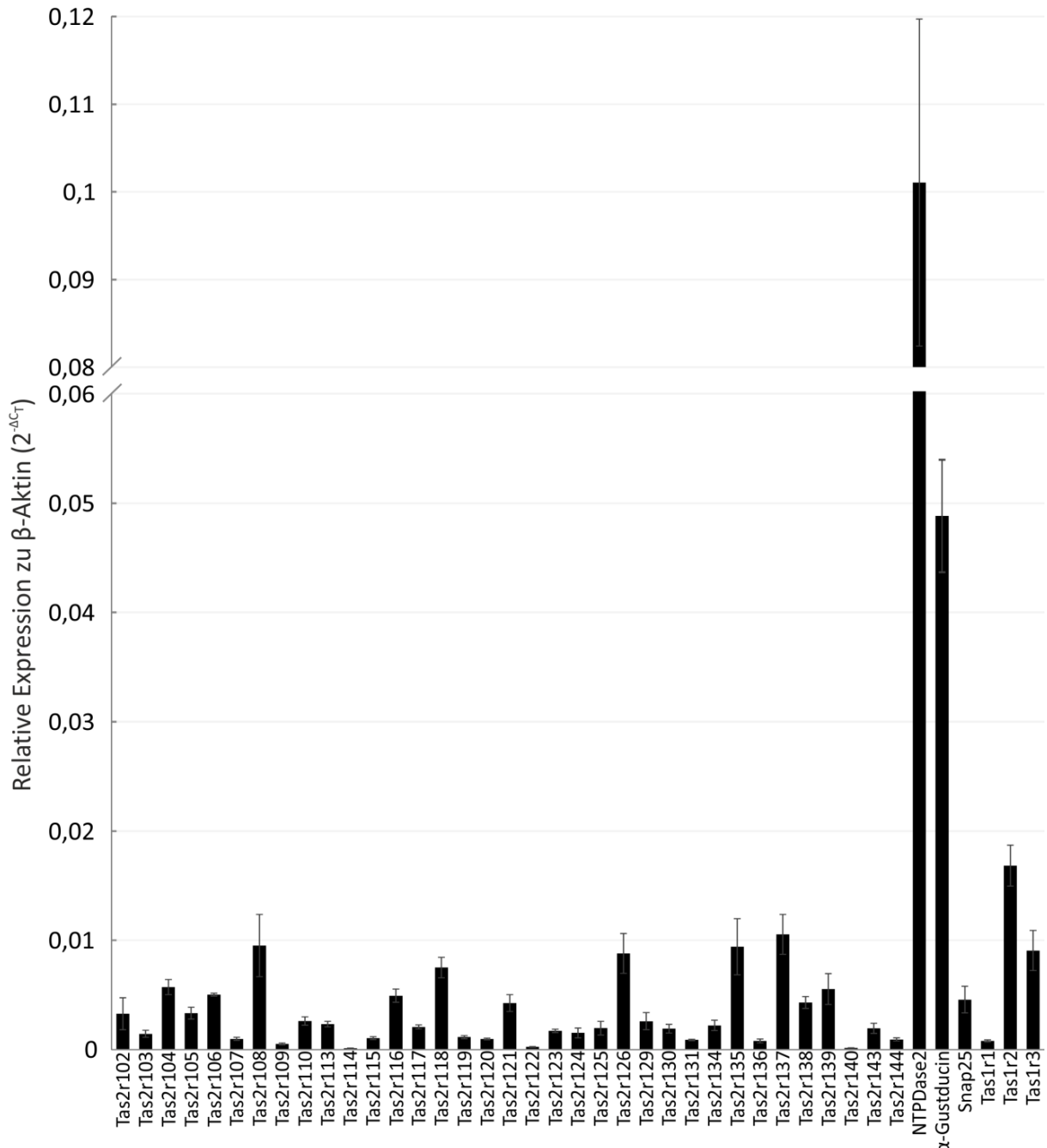


Abbildung 14: Expressionslevel aller Tas2r- und Tas1r-mRNA-Sequenzen, sowie von NTPDase2, α -Gustducin und Snap25 in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Epithel von C57BL/6-Mäusen. Unter Verwendung von cDNA (2.2.3.3, Seite 42) als Matrize, wurde die mRNA-Expression aller untersuchten Gene in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Zungenepithel nachgewiesen. n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm SD.

Tabelle 35: Expressionswerte aller Tas2r- und Tas1r-mRNA-Sequenzen, sowie von NTPDase2, α -Gustducin und Snap25 in VP+FoP-Zungenepithel von C57BL/6-Mäusen. Linke Spalten – Reihenfolge nach Bezeichnung; Rechte Spalten – aufsteigend geordnet nach $2^{-\Delta CT}$ -Wert.

Relative (n-fache) Expression zu β -Aktin			Relative (n-fache) Expression zu β -Aktin aufsteigend nach $2^{-\Delta CT}$ -Wert		
Untersuchte Sequenz	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SD	Untersuchte Sequenz	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SD
Tas2r102	0,0033	0,0029	Tas2r114	0,0001	<0,0001
Tas2r103	0,0014	0,0006	Tas2r140	0,0002	<0,0001
Tas2r104	0,0057	0,0014	Tas2r122	0,0002	0,0001
Tas2r105	0,0033	0,0011	Tas2r109	0,0005	0,0002
Tas2r106	0,0050	0,0002	Tas1r1	0,0008	0,0002
Tas2r107	0,0010	0,0003	Tas2r136	0,0008	0,0004
Tas2r108	0,0095	0,0057	Tas2r131	0,0009	0,0002
Tas2r109	0,0005	0,0002	Tas2r144	0,0009	0,0003
Tas2r110	0,0026	0,0008	Tas2r120	0,0010	0,0001
Tas2r113	0,0023	0,0005	Tas2r107	0,0010	0,0003
Tas2r114	0,0001	<0,0001	Tas2r115	0,0010	0,0003
Tas2r115	0,0010	0,0003	Tas2r119	0,0011	0,0003
Tas2r116	0,0049	0,0012	Tas2r103	0,0014	0,0006
Tas2r117	0,0020	0,0004	Tas2r124	0,0015	0,0009
Tas2r118	0,0075	0,0019	Tas2r123	0,0017	0,0003
Tas2r119	0,0011	0,0003	Tas2r130	0,0019	0,0008
Tas2r120	0,0010	0,0001	Tas2r143	0,0019	0,0009
Tas2r121	0,0043	0,0016	Tas2r125	0,0020	0,0013
Tas2r122	0,0002	0,0001	Tas2r117	0,0020	0,0004
Tas2r123	0,0017	0,0003	Tas2r134	0,0022	0,0010
Tas2r124	0,0015	0,0009	Tas2r113	0,0023	0,0005
Tas2r125	0,0020	0,0013	Tas2r129	0,0026	0,0016
Tas2r126	0,0088	0,0036	Tas2r110	0,0026	0,0008
Tas2r129	0,0026	0,0016	Tas2r102	0,0033	0,0029
Tas2r130	0,0019	0,0008	Tas2r105	0,0033	0,0011
Tas2r131	0,0009	0,0002	Tas2r121	0,0043	0,0016
Tas2r134	0,0022	0,0010	Tas2r138	0,0043	0,0011
Tas2r135	0,0094	0,0052	Snap25	0,0046	0,0024
Tas2r136	0,0008	0,0004	Tas2r116	0,0049	0,0012
Tas2r137	0,0105	0,0036	Tas2r106	0,0050	0,0002
Tas2r138	0,0043	0,0011	Tas2r139	0,0055	0,0028
Tas2r139	0,0055	0,0028	Tas2r104	0,0057	0,0014
Tas2r140	0,0002	<0,0001	Tas2r118	0,0075	0,0019
Tas2r143	0,0019	0,0009	Tas2r126	0,0088	0,0036
Tas2r144	0,0009	0,0003	Tas1r3	0,0091	0,0037
NTPDase2	0,1011	0,0373	Tas2r135	0,0094	0,0052
α -Gustducin	0,0488	0,0103	Tas2r108	0,0095	0,0057
Snap25	0,0046	0,0024	Tas2r137	0,0105	0,0036
Tas1r1	0,0008	0,0002	Tas1r2	0,0168	0,0037
Tas1r2	0,0168	0,0037	α -Gustducin	0,0488	0,0103
Tas1r3	0,0091	0,0037	NTPDase2	0,1011	0,0373

n = 4, Werte sind Mittelwerte \pm SD

3.1.3.1.2 Darstellung der in qRT-PCR erhaltenen PCR-Produkte

Nach den quantitativen Expressionsanalysen mittels *Real-Time*-RT-PCR wurden die aus cDNA von VP+FOF-Zungenepithel amplifizierten PCR-Produkte exemplarisch auf 3,5%ige Agarosegele aufgetragen, um zu überprüfen, ob die zu erwartenden Fragmentgrößen (Tabelle 11 und Tabelle 12, Seiten 28-31) entstanden sind (siehe Abbildung 15).

Die hier in Abbildung 15 beispielhaft dargestellten PCR-Fragmente stammen dabei sowohl aus den Analysen der mRNA-Expression im C57BL/6-Mäusen, als auch von Expressionsanalysen in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Zungenepithel von anderen Wildtyp-Mäusen (z. B. Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}).

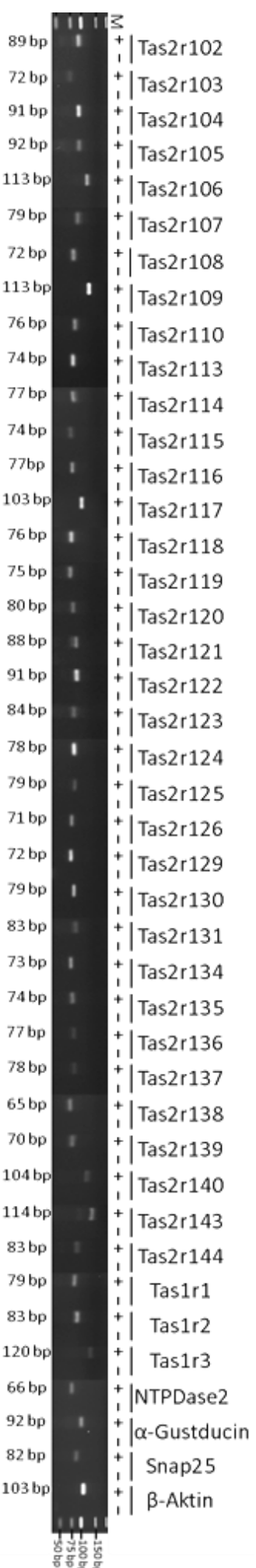


Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der in quantitativer *Real-Time*-PCR erhaltenen PCR-Produkte aus mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Zungenepithel von Wildtyp-Mäusen. Für die qRT-PCR-Reaktionen wurden jeweils +RT-cDNA (+) oder -RT-cDNA (-) als Matrizen verwendet. Die Übersicht der 42 verschiedenen qRT-PCR-Produkte wurde aus mehreren einzelnen Gelbildern zusammengestellt. M = Marker (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix*).

Es wird deutlich, dass für jede in den qRT-PCR-Experimenten als exprimiert gefundene mRNA-Sequenz auch ein PCR-Fragment von erwarteter Größe (Tabelle 11 und Tabelle 12, Seiten 28-31) im Agarosegel darstellbar ist. Dies dient als zusätzlicher Beweis für die tatsächliche Expression aller dieser untersuchten mRNA-Sequenzen (Tas2r-Sequenzen, Tas1r1-Sequenzen, NTPdase2, α-Gustducin und Snap25) in Wall- und Blätterpapillen angereichertem Zungengewebe und für die Spezifität der einzelnen qRT-PCR-Reaktionen.

Außerdem ist ersichtlich, dass PCR-Produkte ausschließlich aus +RT-cDNA (+) amplifiziert worden sind, nicht jedoch aus -RT-cDNA (-) (für +/-RT-cDNA-Synthese siehe 2.2.3.3, Seite 42)

3.1.3.1.3 Kontrolle der Expression von Geschmacksrezeptoren in nichtgustatorischem Zungenepithel und in Blut

Nachdem mRNA von allen Tas2r-, Tas1r- und Geschmacks-assoziierten Genen in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem (VP+FoP) Zungenepithel nachweisbar war, sollte überprüft werden, ob diese Expression auch wirklich nur im Papillengewebe besteht. Dazu wurde einerseits Zungenepithel untersucht, welches keine Geschmacks-papillen enthielt (siehe 2.2.3.1, Seite 40), um auf eine mögliche Expression in Epithel-zellen außerhalb dieser zu prüfen. Außerdem wurde Vollblut von C57BL/6-Mäusen analysiert, da es bereits Hinweise darauf gibt, dass Geschmacksrezeptoren auch im Blut exprimiert sind (siehe auch Abbildung 9 und Bromke 2013). In beiden Geweben wurden von mindestens zwei unabhängigen Tieren mittels qRT-PCR-Reaktionen die Expressionslevel aller Tas2r-, aller Tas1r-, sowie NTPDase2-, Snap25- und α -Gustducin-mRNA ermittelt. Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 16 dargestellt, wobei nur im Falle einer detektierten spezifischen mRNA-Sequenz die Werte der mittleren Expressionslevel \pm SE gezeigt sind.

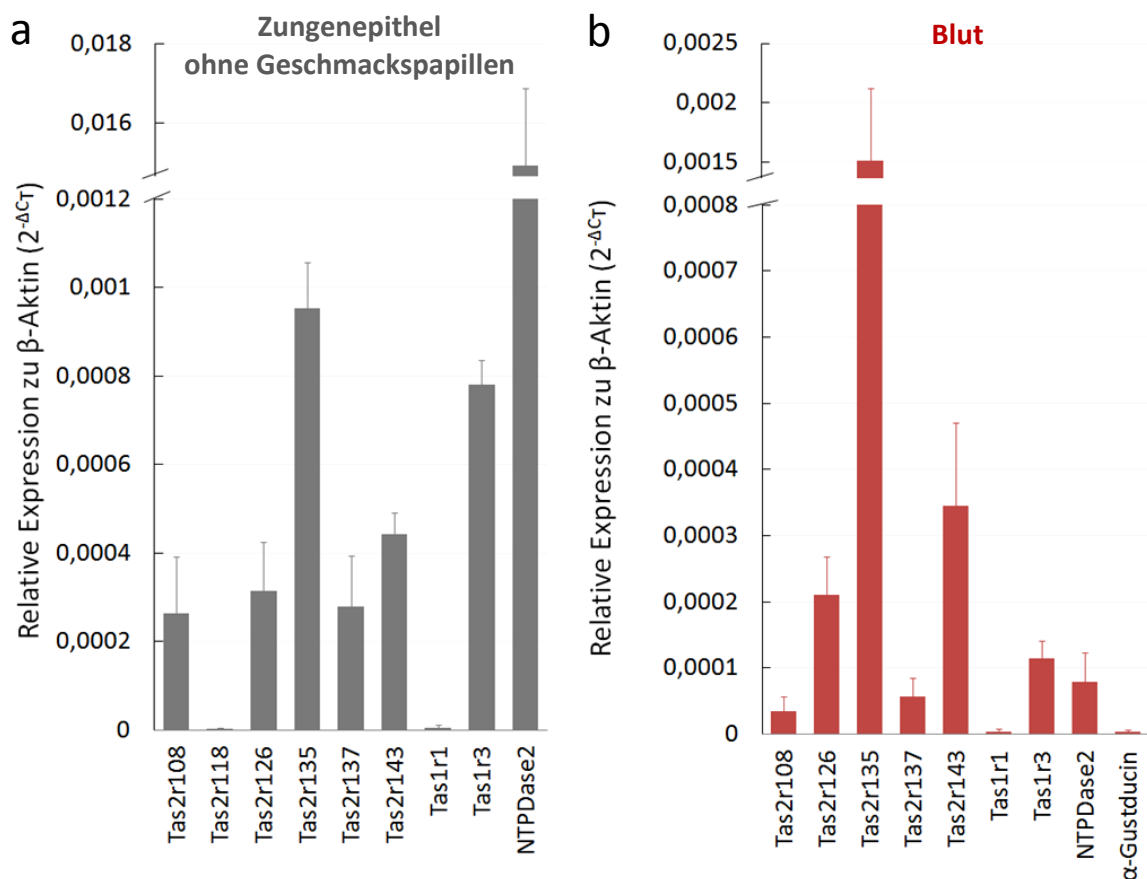


Abbildung 16: Expressionsanalysen von Tas2r-, Tas1r-mRNA, sowie von NTPDase2, α -Gustducin und Snap25 in Zungenepithel ohne Geschmackspapillen und Blut von C57BL/6-Mäusen. Unter Verwendung von cDNA (2.2.3.3, Seite 42) als Matrize, wurde die Expression aller untersuchten Gene auf mRNA-Ebene in (a) Geschmackspapillen-freiem Zungenepithel (n = 2–3) und (b) Blut (n = 2–4) nachgewiesen. Dargestellt sind jeweils alle detektierten mRNA-Expressionslevel. Werte sind Mittelwerte \pm SE.

3 Ergebnisse

In Abbildung 16a ist dargestellt, dass durch qRT-PCR mRNA-Sequenzen von Tas2r108, Tas2r118, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137, Tas2r143, Tas1r1, Tas1r3 und NTPDase2 auch im nichtgustatorischen Zungenepithel nachweisbar sind. Dabei ist Tas2r118-mRNA jedoch nur marginal und auch nur in einem von drei Tieren zu detektieren. Auch das mittlere mRNA-Expressionslevel von Tas1r1 ist insgesamt sehr gering (siehe auch Tabelle 36). In Abbildung 16b ist zu sehen, dass mRNA-Sequenzen von Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137, Tas2r143, Tas1r1, Tas1r3, NTPDase2 und α -Gustducin in Blut von C57BL/6-Mäusen detektierbar sind. Für α -Gustducin ist die mRNA-Expression jedoch auch nur in einem von drei untersuchten Tieren eindeutig messbar. Somit ist das Expressionsspektrum in Blut vergleichbar mit dem in nichtgustatorischem Zungenepithel. Ausnahmen bilden Tas2r118, dessen mRNA nicht im Blut messbar ist, und α -Gustducin, dessen mRNA nicht im nichtgustatorischen Zungenepithel detektierbar ist.

Tabelle 36: Vergleich der Mittelwerte relativer mRNA-Expressionslevel verschiedener Tas2r, Tas1r, NTPDase2 und α -Gustducin in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Epithel (VP+FoP), Zungenepithel ohne Geschmackspapillen (Epithel) und Blut von C57BL/6-Mäusen.

Untersuchtes Gen	Relative Expression zu β -Aktin in VP+FoP		Relative Expression zu β -Aktin in Epithel		Relative Expression zu β -Aktin in Blut	
	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE
Tas2r108	0,00951	0,00285	0,00026	0,00007	0,00003	0,00002
Tas2r118	0,00750	0,00094	<0,00001	<0,00001	0	0
Tas2r126	0,00880	0,00182	0,00031	0,00006	0,00021	0,00006
Tas2r135	0,00942	0,00258	0,00095	0,00006	0,00151	0,00061
Tas2r137	0,01054	0,00182	0,00028	0,00007	0,00006	0,00003
Tas2r143	0,00194	0,00046	0,00044	0,00003	0,00034	0,00013
Tas1r1	0,00079	0,00010	0,00001	0,00001	<0,00001	<0,00001
Tas1r3	0,00906	0,00184	0,00078	0,00004	0,00011	0,00003
NTPDase2	0,10106	0,01866	0,01494	0,00137	0,00008	0,00005
α -Gustducin	0,04883	0,00515	0	0	<0,00001	<0,00001

Werte sind Mittelwerte, \pm SE, n = 2–5

Vergleicht man die Expressionslevel der mRNA von Rezeptoren, die sowohl in nichtgustatorischem Zungenepithel, als auch in Blut exprimiert sind, fällt auf, dass diese für Tas2r126, Tas2r135 und Tas2r143, sowie Tas1r1 ähnlich sind (Abbildung 16 und Tabelle 36). Alle anderen mRNA-Rezeptor-Expressionslevel weichen deutlich voneinander ab (Tabelle 36). Tas2r108-mRNA ist \sim 8,7-fach stärker, Tas2r137-mRNA ist \sim 4,7-fach stärker in nichtgustatorischem Epithel, als in Blut exprimiert. Tas1r3 hat ein etwa 7,1-fach höheres Expressionslevel in nichtgustatorischem Zungenepithel, als in Blut. Das NTPDase2-mRNA-Expressionslevel ist im Geschmackspapillen-freien Zungenepithel mehr als 100-fach höher, als in Blut (Tabelle 36).

Jedoch alle Rezeptor-, bzw. auch NTPDase2- und α -Gustducin-mRNA-Expressionslevel erreichen deutlich höhere Werte in VP+FoP-Zungenepithel, als in Zungenepithel ohne Geschmackspapillen oder im Blut (Tabelle 36). Dies veranschaulicht auch Abbildung 17, in der die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen in VP+FoP-Zungenepithel, ver-

gleichend mit den mRNA-Expressionswerten in Zungenepithel ohne Geschmackspapillen und in Blut von C57BL/6-Mäusen dargestellt sind.

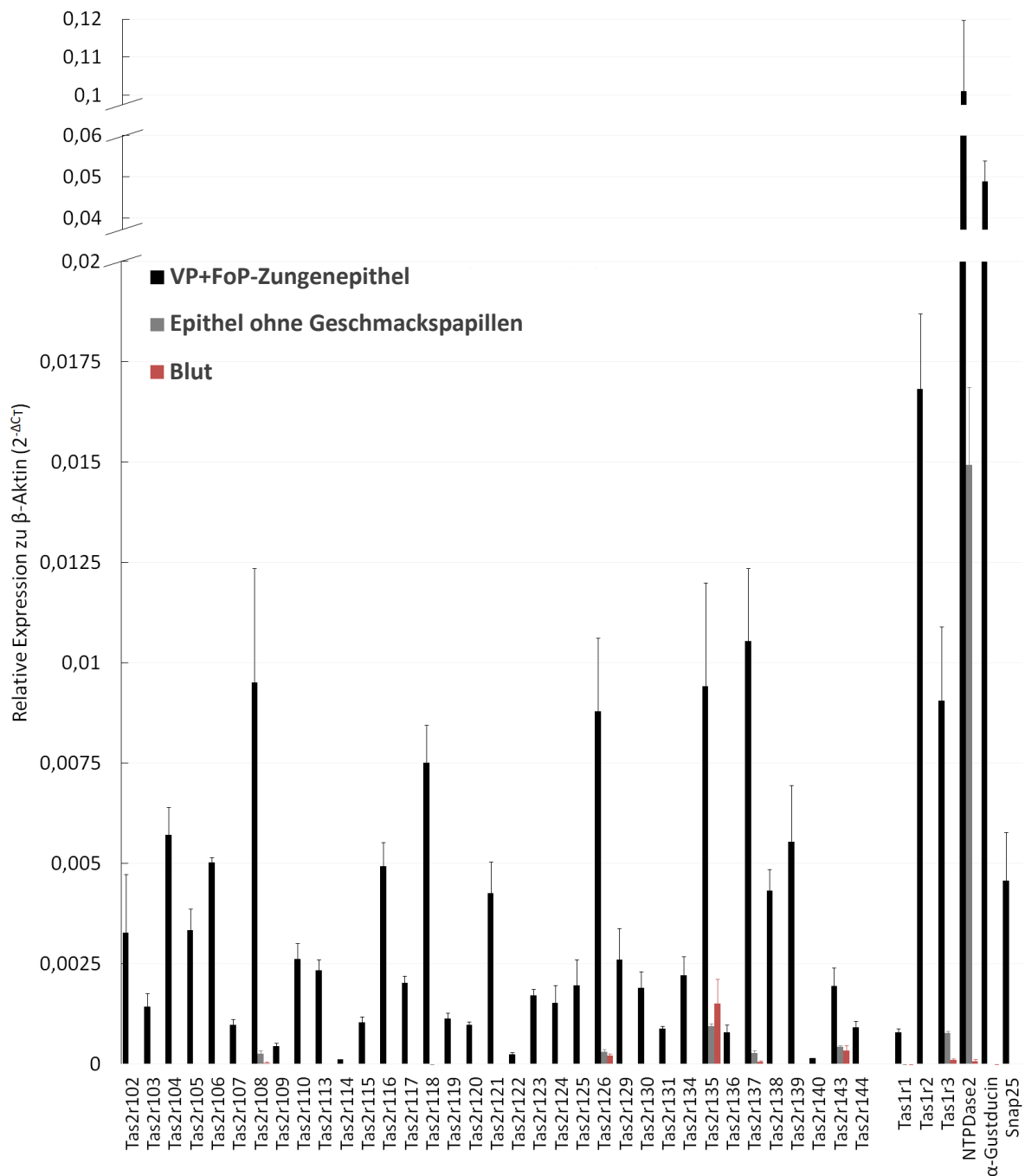


Abbildung 17: Vergleich der Expressionslevel aller Tas2r-, aller Tas1r-, sowie NTPDase2-, α-Gustducin- und Snap25-mRNA in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Epithel (aus Abbildung 14, Zungenepithel ohne Geschmackspapillen und Blut (aus Abbildung 16) von C57BL/6-Mäusen. Werte sind Mittelwerte ± SE.

Deshalb konnte nun davon ausgegangen werden, dass in Wall- und/oder Blätterpapillen mRNA aller untersuchten Gene vorliegt, die Identität der exprimierenden Zellen blieb jedoch bis zu diesem Zeitpunkt ungeklärt.

3.1.3.2 Zelluläre Tas2r-mRNA-Analyse in der Wallpapille mittels ISH

Um eine Vorstellung zu gewinnen, wie sich die bereits im Wall- und Blätterpapillengewebe betrachteten unterschiedlichen Expressionslevel der Bitterrezeptor-mRNA auf Einzelzellebene abbilden, sollten ausgewählte Tas2r-mRNA (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r120, Tas2r126, Tas2r138, Tas2r143) mittels RNA-Sonden direkt im Wallpapillen-Zungengewebe nachgewiesen werden. Interessant war auch die Frage, ob Bitterrezeptoren, von denen mRNA auch im Blut und im nichtgustatorischen Zungengewebe nachweisbar ist (Abbildung 16, Tabelle 36), überhaupt in Zellen der Geschmacksknospen zu finden sind, was das deutlich höhere Expressionslevel in Wall- und Blätterpapillen angereichertem Zungengewebe durchaus vermuten ließe (siehe Abbildung 17). Diese Frage sollte am Beispiel von Tas2r126 und Tas2r143 geklärt werden. Dazu wurden für die genannten Tas2r und für α -Gustducin als Kontrolle *In-situ*-Hybridisierungen mit Nachweis durch BCIP und NBT (2.2.4.4.4–2.2.4.4.7, Seiten 31–33) durchgeführt, in welchen DIG-markierte RNA-Sonden mit der Gegenstrang-mRNA-Sequenz an die gesuchte Tas2r-mRNA binden (*antisense*-Sonde). Als Negativkontrolle für unspezifische Bindungen wurden auch RNA-Sonden mit der Sequenz des kodierenden Stranges prozessiert (*sense*-Sonde).

In der linken Bildreihe von Abbildung 18 ist deutlich zu erkennen, dass in Geschmacksknospenzellen der Wallpapille mRNA von allen untersuchten Bittergeschmacksrezeptoren und von α -Gustducin auffindbar sind. Dabei ist hervorzuheben, dass auch die in Blut und Geschmackspapillen-freiem Epithel exprimierten Tas2r126- und Tas2r143-mRNA-Sequenzen in einzelnen Zellen der Geschmacksknospen nachweisbar sind und keine umliegenden Zellen offensichtliche Markierungen für Tas2r126- oder Tas2r143-mRNA zeigen. Bei Vergleich aller Experimente erscheinen die für die verschiedenen Bitterrezeptor-mRNA markierten Zellen unterschiedlich stark gefärbt zu sein. Außerdem ist feststellbar, dass – abhängig vom untersuchten Rezeptor – auch unterschiedlich viele Zellen in den einzelnen Geschmacksknospen markiert scheinen. Von α -Gustducin konnte in vielen Zellen mRNA mit starken Signalen detektiert werden. Hingegen sind alle zur Kontrolle mit entsprechenden *sense*-Sonden behandelten Gewebeschnitte frei von Markierungen (Abbildung 18, rechte Bildreihe).

Diese Befunde deuten somit auf eine inhomogene Expression von Bitterrezeptoren in den Tas2r exprimierenden Zellen hin, wobei die hier in der ISH schwächer oder weniger exprimiert erscheinenden Bitterrezeptor-mRNA-Sequenzen, wie z. B. von Tas2r120, zuvor auch geringere Expressionslevel in den qRT-PCR-Experimenten aufwiesen (siehe Abbildung 14). Rezeptoren, für welche in den ISH-Experimenten eine stärkere Markierung oder eine höhere Anzahl mRNA-markierter Zellen nachweisbar sind, wie z. B. Tas2r118, zeigten in den quantitativen Expressionsanalysen auch höhere mRNA-Expressionslevel (siehe Abbildung 14). Dies sollte in den folgenden Versuchen an genetisch veränderten Mäusen genauer untersucht werden.

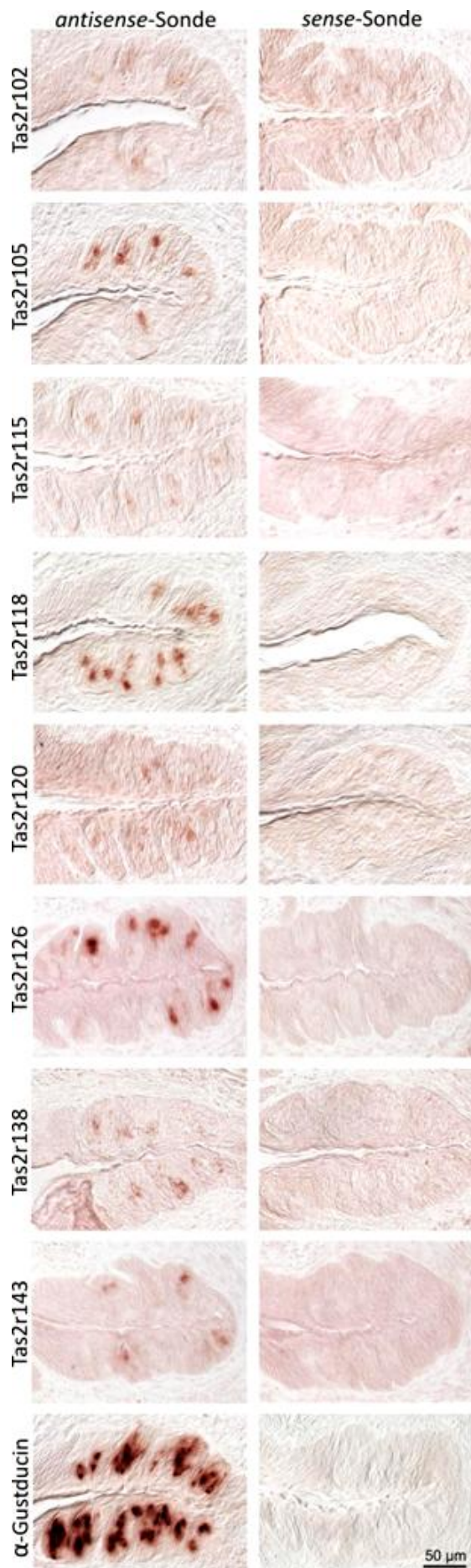


Abbildung 18: Nachweis der mRNA von acht ausgewählten Bitterrezeptoren (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r120, Tas2r126, Tas2r138, Tas2r143) und α -Gustducin in Wallpapillen-Gewebschnitten von C57BL/6-Mäusen. *In-situ*-Hybridisierung (2.2.4.6, Seite 52) unter Verwendung von mRNA-spezifischen Tas2r- sowie α -Gustducin-Sonden (siehe 2.2.4.6 ab Seite 52). Prozessiert wurden 10 μ m dicke Gewebeschnitte durch Wallpapillen aus C57BL/6-Zungen. Die Detektion der Sonden erfolgte mittels BCIP und NBT-Nachweis. Mittels *antisense*-Sonden wurden für alle untersuchten mRNA-Sequenzen Geschmacksknospenzellen unterschiedlicher Intensität und Anzahl markiert (linke Bilderreihe), durch die *sense*-Sonden wurden keine Zellen markiert (rechte Bildreihe).

3.2 Expressionsmuster von Maus-Bitterrezeptoren in Geschmackszellpapillen

In der Literatur gibt es verschiedene Hinweise darauf, dass die Gesamtheit der Maus-Bittergeschmacksrezeptoren nicht uniform in einer Bitterzellpopulation exprimiert wird (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000; Caicedo und Roper 2001), sondern eine heterogene Verteilung vorliegt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Analyse der Bitterrezeptor-Expressionsmuster in Geschmackspapillen des Modellorganismus Maus, im Hinblick auf eine mögliche Existenz von spezifischen Tas2r exprimierenden Zellsubpopulationen, durchgeführt. Dazu wurde die Tas2r-Ko-Expression in Mäusen mit gezielt genetisch modifiziertem Tas2r131-Locus untersucht. Um eine Zufälligkeit der erhaltenen Ergebnisse auszuschließen, wurden für diese Experimente verschiedene Mauslinien genutzt (2.1.10.1, 2.1.10.3, 2.1.10.4, Seite 33). Für die Analysen wurden jeweils mit Wall- und Blätterpapillen angereicherte Gewebe oder Wall- bzw. Blätterpapillen-Gewebeschnitte verwendet, da, wie zuvor gezeigt (3.1.2.2), innerhalb der Maus-Zunge der Bitterrezeptor Tas2r131 vorwiegend in diesen Papillen-Arten exprimiert ist.

3.2.1 Analysen in Mäusen mit Fluoreszenzreporter für Tas2r131

Zur Erforschung der Expression von Bitterrezeptoren innerhalb der Bittergeschmacksrezeptorzellen, wurde zuerst in der zuvor charakterisierten Tas2r131^{BLiG}-Mauslinie (3.1.2-3.1.2.3, ab Seite 68; Voigt, Hübner *et al.* 2012) die Expression des Bitterrezeptors Tas2r131 genauer untersucht. Dabei sollte aufgeklärt werden, wie viele Bitterrezeptorzellen Tas2r131 exprimieren, wie die Ko-Expression dieses Rezeptors mit anderen Bitterrezeptoren ist und ob es noch andere Tas2r exprimierende Geschmackszellpapillen gibt. Außerdem sollte ergründet werden, ob eine zufällige Tas2r-Ko-Expression vorherrscht, oder ob spezielle Expressionsmuster existieren.

3.2.1.1 Zelluläre hrGFP-Expression im Vergleich zu α -Gustducin

Für die Wallpapille der Maus ist bereits bekannt, dass Bitterrezeptoren innerhalb einer Subpopulation von α -Gustducin exprimierenden Zellen vorkommen (Adler, Hoon *et al.* 2000) und, dass 82% aller α -Gustducin-Zellen Tas2r ko-exprimieren (Stone, Barrows *et al.* 2007). Als Ausgangspunkt für die Charakterisierung der Bitterrezeptor exprimierenden Zellen wurde untersucht, in wie vielen Geschmacksknospenzellen der Tas2r131-Reporter, hrGFP, vorkommt. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob Tas2r131-Zellen (hrGFP-positive Zellen) tatsächlich eine Subpopulation von ausschließlich α -Gustducin exprimierenden Zellen bilden und, wenn dies zutrifft, wie groß diese Subpopulation ist. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass das Tas2r131-Reporterprotein, hrGFP, hauptsächlich in Wall- und Blätterpapillen exprimiert ist (siehe Abbildung 11), wurden für diese Untersuchung Wall- oder Blätterpapillen-Gewebeschnitte von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen prozessiert. Mittels immunhistochemischen

Nachweises (siehe 2.2.4.5, Seite 51) wurden alle α -Gustducin-Proteine rot markiert (Abbildung 19a). In denselben Schnitten wurde außerdem die grüne hrGFP-Fluoreszenz sowie die Zellkerne in blau visualisiert. Mittels Konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie erfolgten Dokumentation und zugleich Digitalisierung der prozessierten Gewebeschnitte. Beispielbilder davon sind in Abbildung 19a gezeigt. Als Kontrolle für die spezifische Bindung des primären α -Gustducin-Antikörpers diente ein Blockierungs-Peptid, unter dessen Anwendung (2.2.4.5, Seite 51) keine rote Markierung entstand (Abbildung 19b). In einzelnen Geschmacksknospenquerschnitten (≥ 16) wurden hrGFP-positive Zellen sowie α -Gustducin-positive Zellen und deren Überlappung im Vergleich zur Gesamtzellzahl von je fünf bis sechs unabhängigen Mäusen ausgezählt. Dabei wurde die Gesamtzellzahl anhand der blauen Kernfärbung von je vier bzw. fünf Tieren ermittelt (Tabelle 37).

Tabelle 37: Immunhistochemischer Nachweis von α -Gustducin in Wall- und Blätterpapillen-Gewebeschnitten (10 μ m) von homozygoten Tas2r131^{Blig}-Mäusen. Werte der einzelnen Tiere.

Tier - Bezeichnung/Nummer		Zellen/ Kerne	hrGFP- Zellen	α -Gustducin+ hrGFP-Zellen	α -Gustducin- Zellen insg.	α -Gustducin-Zellen ohne hrGFP	
Walpapille (VP)	Tas2E3 hom. 3300/7 m2	MW	12,31	1,75	1,75	3,38	1,63
		%		14,21	51,85*	27,41	13,20
	Tas2E3 hom. 4015/2 f2	MW	18,69	2,00	2,00	4,56	2,56
		%		10,70	43,84*	24,41	13,71
	Tas2E3 hom. 3599/9 f4	MW	21,83	2,36	2,35	5,30	2,95
		%		10,80	44,34*	24,29	13,52
	Tas2D2 hom. 4894/4 m2	MW	22,92	2,69	2,69	5,04	2,35
		%		11,74	53,44*	21,98	10,23
	Tas2E3 hom. m417	MW	-	2,05	2,05	3,78	1,73
		%		-	54,29*	-	-
	4353_6_m2	MW	19,70	2,09	2,09	3,80	1,71
		%		10,60	54,96*	19,28	8,68
n = 6	MW	19,09	2,16	2,16	4,31	2,15	
	±	4,14	0,33	0,33	0,77	0,55	
Blätterpapillen (FoP)	Tas2E3 hom. 3599/9 f4	MW	22,20	2,23	2,23	4,14	1,92
		%		10,03	53,73*	18,67	8,64
	Tas2E3 hom 4015/2 f2	MW	15,00	1,97	1,97	3,37	1,37
		%		13,11	58,42*	22,44	9,11
	Tas2E3 hom 3300/7 m5	MW	15,45	1,91	1,91	4,59	2,68
		%		12,35	41,58*	29,71	17,35
	Tas2D2 hom. 4894/4 m2	MW	17,92	2,14	2,02	3,73	1,71
		%		11,93	54,21*	20,79	9,52
	Tas2E3 hom. m417	MW	-	1,74	1,74	3,16	1,42
		%		-	-	-	-
	n = 4	MW	17,64	2,00	1,97	3,80	1,82
		±	3,30	0,19	0,18	0,58	0,53

* % positive hrGFP-Zellen anteilig der α -Gustducin-positiven Zellen

Die daraus ermittelten prozentualen Durchschnittswerte der hrGFP- (Tas2r131-) und α -Gustducin-Zellen innerhalb von Geschmacksknospenquerschnitten sind in

3 Ergebnisse

Abbildung 19c dargestellt. Es wird ersichtlich, dass in Wallpapillen (VP) dieser Tiere $\sim 23\% \pm 3\%$ der Geschmacksknospenzellen das Protein, α -Gustducin, und $\sim 12\% \pm 2\%$ den Tas2r131-Reporter, hrGFP, exprimieren. Dabei bilden die hrGFP-Zellen eine α -Gustducin-Subpopulation von etwa $50\% \pm 5\%$. In den Geschmacksknospen der Blätterpapillen sind $\sim 23\% \pm 5\%$ α -Gustducin-Zellen und $\sim 12\% \pm 1\%$ hrGFP-Zellen zu finden, wobei die hrGFP-Zellen eine Subpopulation von $\sim 52\% \pm 7\%$ der α -Gustducin-Protein exprimierenden Zellen bilden. In den Auszählungen gab es keine hrGFP-positiven Zellen, die nicht auch α -Gustducin-positiv waren. Folglich bilden auf Protein-Ebene in Wall- und Blätterpapillen der Tas2r131^{BLIG/BLIG}-Mäuse Tas2r131 exprimierende Zellen immer eine Subpopulation der α -Gustducin exprimierenden Zellen.

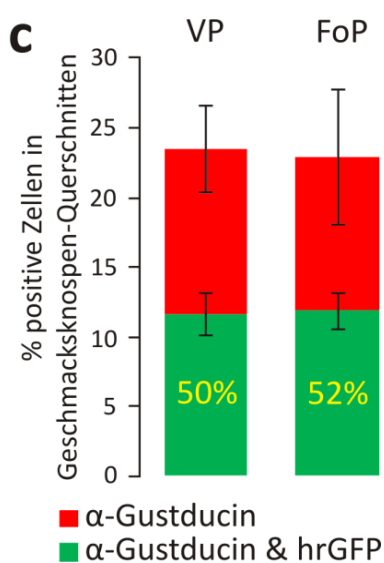
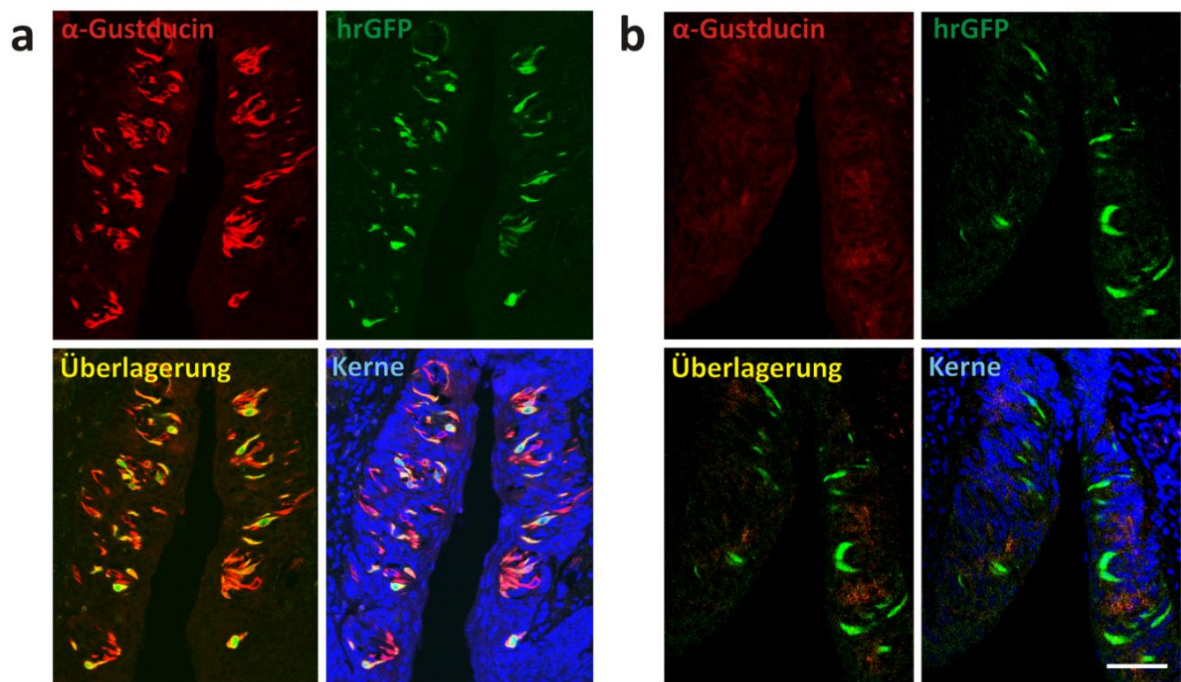
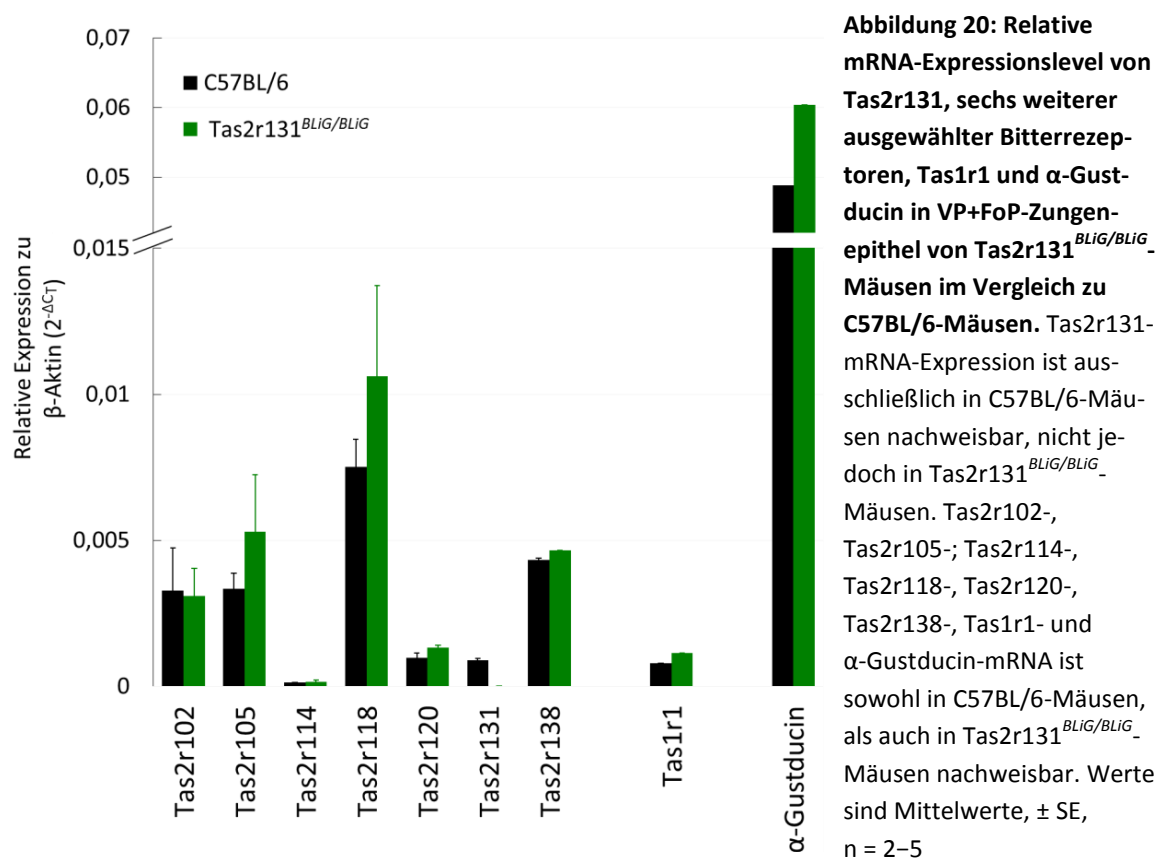


Abbildung 19: Immunhistochemischer Nachweis von α -Gustducin in Wall- und Blätterpapillen-Gewebeschnitten (10 μ m) von homozygoten Tas2r131^{BLIG}-Mäusen. a) Beispielbilder für das Ergebnis einer in einem Wallpapillen-Gewebeschnitt durchgeführten α -Gustducin-Antikörperfärbung, gefolgt von Kernfärbung (siehe 2.2.4.5, Seite 51). Es wird deutlich, dass mehr α -Gustducin-positive Zellen (rot) vorhanden sind, als solche, die durch den endogen exprimierten Fluoreszenzmarker, hrGFP (grün), markiert sind. b) Die Spezifität des primären Antikörpers konnte durch eine Kontrolle, bei der dieser Antikörper mit einem Blockierungs-Peptid vorbehandelt wurde, gezeigt werden. Denn keine Zellen zeigen eine rote Färbung. Maßstab: 50 μ m. c) Sowohl grün-, als auch rot-markierte Zellen wurden im Vergleich zur Gesamtzellzahl für ≥ 16 Geschmacksknospen in Wall- und Blätterpapillen ausgezählt. In Wallpapillen sind etwa 50% der α -Gustducin-Zellen auch hrGFP-positiv, in Blätterpapillen rund 52%. Werte sind Mittelwerte \pm SD. n = 4–5

Anhand der hier gezeigten Ergebnisse (Abbildung 19) kann mit Hilfe der Daten aus der Literatur (Stone, Barrows *et al.* 2007) berechnet werden, dass Tas2r131 exprimierende Zellen ~62% aller Bitterzellen ausmachen ($51\%/82\% = x/100\%$; $x = 62,2\%$, genauere Ausführung siehe Diskussion, Abbildung 33, Seite 127). D. h., es müsste noch weitere Bittergeschmacksrezeptorzellen geben, die nicht Tas2r131 exprimieren.

3.2.1.2 Quantitative mRNA-Analyse der Tas2r in Zungengewebe

Bevor in weiteren Versuchen die Ko-Expression des Tas2r131-Reporterproteins, hrGFP, mit anderen Bittergeschmacksrezeptoren untersucht werden sollte (3.2.1.3), wurde zunächst quantitativ überprüft, wie sich deren mRNA-Expression in Tas2r131^{BLiG/BLiG}- im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen verhält. Dafür wurden exemplarisch sechs weitere Tas2r ausgewählt, die in Abbildung 14 sowohl mittlere Expressionslevel aufweisen (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r138), als auch kaum messbare (Tas2r114) oder relativ hohe (Tas2r118). Außerdem wurde ein Rezeptor gewählt, welcher ein zu Tas2r131 ähnliches Expressionsniveau zeigt (Tas2r120). Vergleichend wurde ferner die mRNA-Expression von Tas1r1 und α -Gustducin mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem (VP+FoP) Epithel bestimmt. (Abbildung 20)



Die in Abbildung 20 dargestellten mRNA-Expressionslevel zeigen, dass in VP+FoP-Epithel von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen die exemplarisch untersuchten Bitterrezeptoren (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r114, Tas2r118, Tas2r120 und Tas2r138), sowie Tas1r1 und α -Gustducin vergleichbar exprimiert sind, wie in C57BL/6-Mäusen. Allein Tas2r131-

3 Ergebnisse

mRNA kann in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen, im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen, nicht mehr nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 38), was auf den *Knock-out* der kodierenden Tas2r131-Sequenz in diesen Tieren zurückzuführen ist. Bei einem genaueren Vergleich der Expressionslevel ($2^{-\Delta CT}$ -Werte) in Tas2r131^{BLiG/BLiG}- mit denen in C57BL/6-Mäusen, ist zu bemerken, dass diese in den Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen tendenziell etwas höher sind (Tabelle 38). Schwach signifikant ist diese Beobachtung jedoch nur für Tas2r120 (Tabelle 38). Dabei ist anzumerken, dass für die Analysen Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäuse genutzt wurden, die aus der sechsten Generation der Rückkreuzung auf C57BL/6 verpaart wurden, und somit noch kein komplett sauberer C57BL/6-genetischer Hintergrund (~96,9%) in dieser Mauslinie bestand.

Tabelle 38: Relative mRNA-Expressionslevel von sieben Bitterrezeptoren, Tas1r1 und α -Gustducin von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen im Vergleich zu C57BL/6-Mäusen.

Untersuchtes Gen	Relative Expression zu β -Aktin in C57BL/6		Relative Expression zu β -Aktin in Tas2r131 ^{BLiG/BLiG}		t-Test Signifikanz C57BL/6 versus Tas2r131 ^{BLiG/BLiG}
	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE	
Tas2r102	0,0033	0,0015	0,0031	0,0010	0,917
Tas2r105	0,0033	0,0005	0,0053	0,0019	0,491
Tas2r114	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,842
Tas2r118	0,0075	0,0009	0,0106	0,0031	0,493
Tas2r120	0,0010	0,0001	0,0013	0,0001	0,019
Tas2r131	0,0009	0,0001	0	0	0,001
Tas2r138	0,0043	0,0005	0,0047	0,0018	0,879
α -Gustducin	0,0488	0,0051	0,0604	0,0154	0,264
Tas1r1	0,0008	0,0001	0,0011	0,0003	0,329

Genauere Zahlenwerte der in Abbildung 20 dargestellten Mittelwerte inklusive Standardfehlern und Signifikanz-Werten der Mittelwertvergleiche beider Tiergruppen. Werte sind Mittelwerte, \pm SE, n = 2–5

Generell liegt eine Vergleichbarkeit der mRNA-Expressionslevel von Bitterrezeptoren, Tas1r1 und α -Gustducin in Tas2r131^{BLiG/BLiG}- und C57BL/6-Mäusen vor, was darauf schließen lässt, dass der *Knock-out* der kodierenden Tas2r131-Sequenz die mRNA-Expression dieser Gene nicht beeinflusst. Somit sind auch in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen generell wieder unterschiedliche Expressionslevel der Bitterrezeptor-mRNA im Gesamt-Wall- und Blätterpapillengewebe zu beobachten.

3.2.1.3 Zelluläre Tas2r-mRNA-Expression in der Wallpapille mittels ISH

Als nächstes wurde mittels ISH (ab Seite 52) mit Detektion der RNA-Sonden durch Fluoreszenz-Nachweis (Tabelle 34) die mRNA-Expression derselben Bitterrezeptoren (wie in 3.2.1.2, außer Tas2r114, anstatt dessen Tas2r115) auf zellulärer Ebene in Wallpapillen (VP) der Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Tiere untersucht. Dabei wurde insbesondere die Ko-Lokalisation der hrGFP-positiven (Tas2r131) Zellen (hier nach ISH, hrGFP-Antikörperfärbung – rot, Tabelle 34, Seite 57) mit den mRNA-positiven Zellen der anderen Bitterrezeptoren betrachtet. So sollte aufgeklärt werden, ob es tatsächlich zusätzliche

Bittergeschmacksrezeptorzellen gibt, die nicht Tas2r131 exprimieren (siehe Abbildung 19).

Die Ergebnisse zu diesen Analysen sind in Abbildung 21 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass mRNA der verschiedenen Bitterrezeptoren sowie α -Gustducin wieder einerseits unterschiedlich stark, und andererseits in unterschiedlich vielen Zellen nachweisbar zu sein scheint (erste Bildreihe, grün, Abbildung 21a). Dagegen scheint der Nachweis des hrGFP-Proteins (Tas2r131-Reporter) immer gleichmäßig stark und in gleichmäßig vielen Zellen durchführbar (zweite Bildreihe, rot, Abbildung 21b). Außerdem wird deutlich, dass hrGFP-Zellen nicht immer mRNA der anderen untersuchten Bitterrezeptoren ko-exprimieren. Andererseits sind hrGFP-negative Zellen zu finden, die mRNA anderer Tas2r als Tas2r131 aufweisen (dritte Bildreihe, Überlagerung, Abbildung 21c). So sind z. B. Tas2r102-, Tas2r105-, Tas2r115-, Tas2r118- oder Tas2r138-mRNA-positive Zellen zu verschiedenen Anteilen auch außerhalb der hrGFP-Zellen zu finden.

Ob diese, teilweise überlappenden Ko-Expressionen bestimmten Mustern unterliegen, sollte dann anhand von Auszählungen der mRNA- und der hrGFP-Protein-positiven Zellen geprüft werden. Dafür wurden von mindestens zwei verschiedenen Mäusen aus jeweils 10 μ m dicken Geschmacksknospenquerschnitten ($n \geq 8$) hrGFP- bzw. Rezeptor-mRNA-positive Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl ausgezählt. Die erhaltenen Mittelwerte mit Standardabweichungen (\pm) sind in Abbildung 21b dargestellt.

Das Tas2r131-Reporterprotein, hrGFP, ist dabei in mindestens 6,6% ($\pm 1,4\%$) bis zu 8,0% ($\pm 1,3\%$) der Geschmacksknospenzellen nachweisbar. D. h., im Mittel enthalten rund 7,1% ($\pm 0,6$) aller Zellen in den Geschmacksknospen das hrGFP-Protein (Abbildung 21b).

Auch konnte anhand der Überlagerung der grün- und rot-markierten Zellen eine Überlappung von hrGFP (Tas2r131) mit den jeweiligen anderen Tas2r-mRNA exprimierenden Zellen geschlussfolgert werden. So ergaben sich im Mittel folgende Werte (Abbildung 21b und c): Tas2r102-mRNA exprimierende Zellen überlappen zu 81% mit hrGFP-positiven Zellen (Abbildung 21c) und sind anteilig in weniger ($4,1\% \pm 1,1\%$) Geschmacksknospenzellen exprimiert (erst Spalte, Tabelle – Abbildung 21b). Tas2r105-mRNA exprimierende Zellen überlappen zu 72% mit hrGFP-positiven und bilden einen Anteil von durchschnittlich $8,3\% \pm 0,3\%$ der Geschmacksknospenzellen. Tas2r115-mRNA exprimierende Zellen überlappen zu 89% mit hrGFP-positiven und sind in rund $6,2\% \pm 0,7\%$ der Geschmacksknospenzellen zu finden. Tas2r118-mRNA exprimierende Zellen weisen von den untersuchten Rezeptoren die größte Häufigkeit auf: Sie bilden einen Anteil von $12,6\% \pm 4,3\%$ der Geschmacksknospenzellen und überlappen nur zu 58% mit den hrGFP-positiven Zellen. Tas2r120-mRNA-positive Zellen weisen die geringste Häufigkeit auf ($3,0\% \pm 0,1\%$) und sind zu 100% mit hrGFP-Zellen ko-exprimiert. Tas2r138-mRNA-positive Zellen sind relativ häufig mit $10,6\% \pm 1,7\%$ der Geschmacksknospenzellen und überlappen zu 64% mit den hrGFP-Zellen.

Zusätzlich bilden die hrGFP-positiven Zellen laut Auszählung eine Subpopulation von 50% der α -Gustducin-mRNA exprimierenden Zellen in der VP (Abbildung 21b und c).

3 Ergebnisse

Dieser Ko-Expressions-Wert entspricht exakt dem Wert, der zuvor anhand des α -Gustducin-Proteinnachweises in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen ermittelt wurde (Abbildung 19).

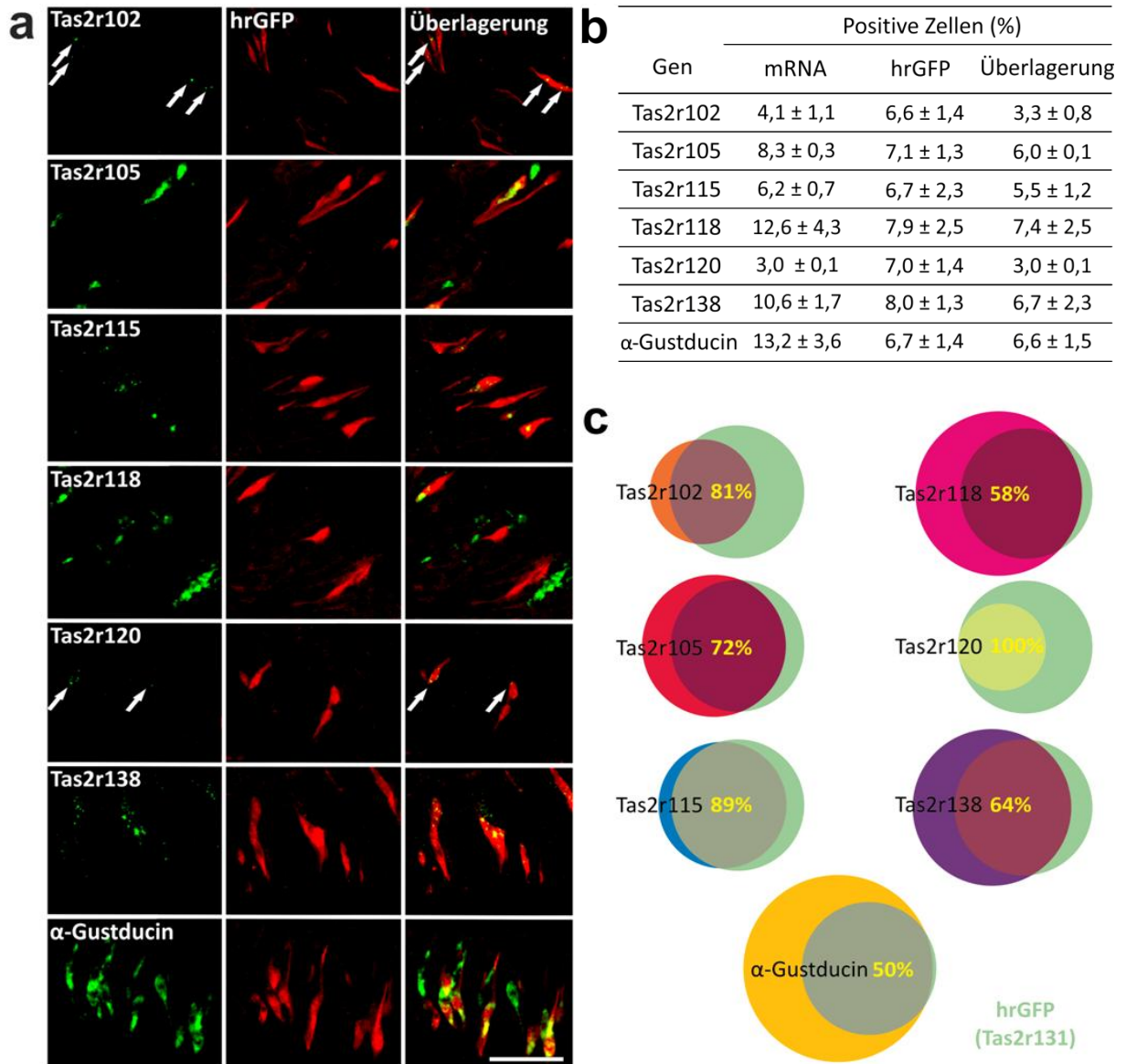


Abbildung 21: Ergebnisse von ISH-Experimenten in Wallpapillen(VP)-Schnitten von homozygoten Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen. a) *In-situ*-Hybridisierungs-Experimente mit *antisense*-Sonden in VP-Gewebeschnitten von Mäusen mit hrGFP-markierten Tas2r131-Zellen zeigen unterschiedlich starke grün dargestellte Markierungen für verschiedene Tas2r- sowie α -Gustducin-mRNA (erste Bilderreihe). Nach Antikörperfärbung (Seite 57) erscheinen die hrGFP-Protein enthaltenden Zellen rot (mittlere Reihe). Es gibt unterschiedliche Überlappungen der verschiedenen Tas2r- oder α -Gustducin-mRNA-positiven Zellen mit hrGFP-Zellen (rechte Bilderreihe). Maßstab: 50 μ M. b) Durch ISH mRNA-markierte Zellen und hrGFP-positive Zellen wurden im Vergleich zur Gesamtzellzahl von $n \geq 2$ Tieren je Geschmacksknospenquerschnitt ($n \geq 8$) ausgezählt. Diese wurden gemittelt und eine Standardabweichung (\pm) bestimmt. c) Venn-Diagramme repräsentieren die Menge und Überlappung von Tas2r- oder α -Gustducin exprimierenden Zellen (farbige Kreise) mit hrGFP-positiven Zellen (grau-grüne Kreise). Die Überlappungen verkörpern die Zellen, welche sowohl für bestimmte Tas2r- oder α -Gustducin-mRNA, als auch für den Tas2r131-Reporter, hrGFP, positiv waren. Dabei geben die Prozent-Zahlen an, wie viele der mRNA-markierten Zellen, auch für hrGFP positiv sind.

Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen der in den *ISH*-Experimenten genutzten RNA-Sonden, wurden neben den *antisense*-Sonden sogenannte *sense*-Sonden, die der nachzuweisenden mRNA-Sequenz entsprechen und somit nicht binden sollten, verwendet (siehe Seite 52). Beispielhafte Bilder von diesen Kontroll-Hybridisierungen sind in Abbildung 22 dargestellt. Es wird ersichtlich, dass keine mRNA der verschiedenen Bitterrezeptoren oder von α -Gustducin nachweisbar ist (erste Bildreihe, Abbildung 22). Dagegen ist der Nachweis von hrGFP (Tas2r131-Reporter) mittels Antikörperfärbung auch hier gleichmäßig stark und in gleichmäßig vielen Zellen durchführbar (zweite Bildreihe, rot, Abbildung 22).

Die Spezifität der (Abbildung 21) genutzten *antisense*-Sonden wurde außerdem in *Dot-Blot*-Hybridisierungen überprüft (siehe Seite 53). Selbst nächstähnliche Tas2r-Sequenzen sind in den *Dot-Blot*-Experimenten mit spezifischen Tas2r-RNA-Sonden nicht oder nur äußerst schwach detektierbar (siehe Anhang, Abbildung 37, Seite 162). Somit ist der Nachweis einer anderen, als der jeweils gesuchten Tas2r-mRNA, unwahrscheinlich.

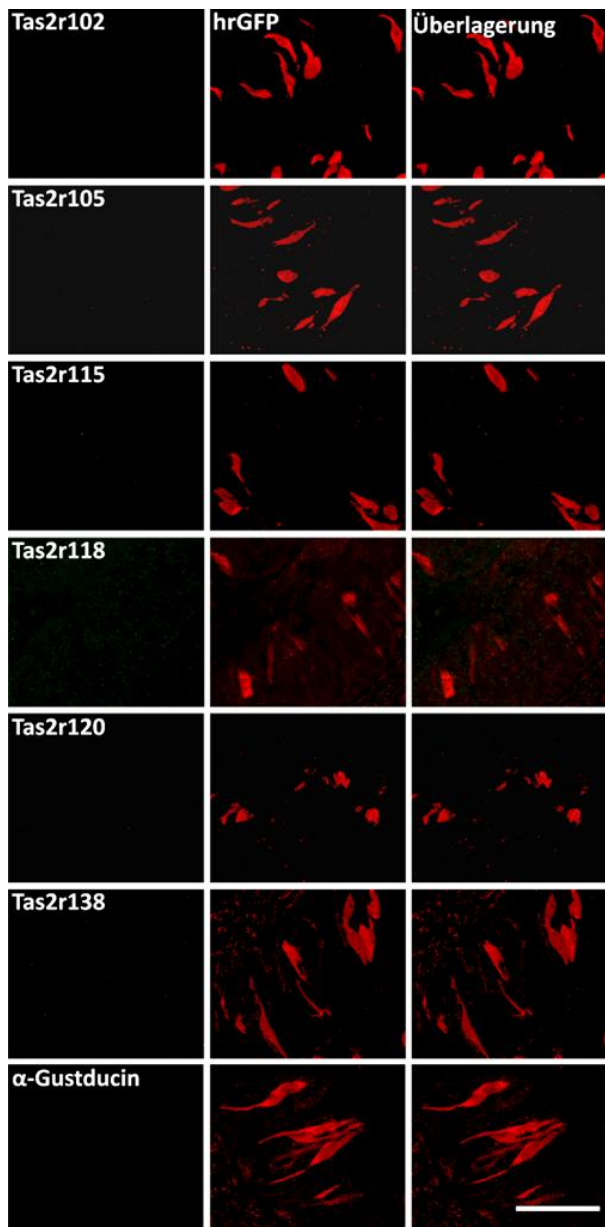


Abbildung 22: Darstellung der Kontrollen zu Abbildung 21a: in *ISH*-Experimenten mit *sense*-Sonden prozessierte Wallpapillen-Schnitte von homozygoten *Tas2r131-knock-out*-Mäusen (*Tas2r131*^{BLiG/BLiG}). Exemplarische Bilder von *In-situ*-Hybridisierungen mit *sense*-Sonden in VP-Gewebeschnitten (10 μ m) zeigen keine markierten Zellen für die verschiedenen Bitterrezeptor- und α -Gustducin-mRNA-Sequenzen in Kontrollmäusen (linke Reihe), dessen ungeachtet erscheinen nach Antikörperfärbung (Seite 57) die hrGFP-Protein enthaltenden Zellen rot (mittlere und rechte Reihe). Maßstab: 50 μ M.

Zusammenfassend zeigen die *ISH*-Analysen in *Tas2r131*^{BLiG/BLiG}-Mäusen deutlich, dass eine heterogene Bitterrezeptor exprimierende Zellpopulation existiert. Es konnte bestätigt werden, dass es unterschiedliche Expressionshäufigkeiten der verschiedenen *Tas2r*-mRNA-Sequenzen gibt, bei der manche Bitterrezeptor-mRNAs in weniger, manche jedoch in einem größeren Anteil von Zellen zu finden sind. Es existieren also tatsächlich Bitterrezeptor-mRNA exprimierende Zellen, die kein hrGFP (*Tas2r131*) aufweisen.

Außerdem überlappt in den einzelnen Geschmacksrezeptorzellen der VP das Tas2r131-Reporterprotein, hrGFP, in unterschiedlichem Ausmaß mit der mRNA von verschiedenen anderen Bitterrezeptoren. Diese Beobachtungen scheinen auch nicht zufällig zu sein. Zum einen wiederholen sich die mit Zahlen unterlegten Expressionshäufigkeiten zwischen einzelnen verschiedenen Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen (siehe Werte der einzelnen Tiere im Anhang Seite 164, Tabelle 43) und sind vergleichbar mit den beobachteten Expressionshäufigkeiten in C57BL/6-Mäusen (Abbildung 18, Seite 80). Zum anderen bilden hrGFP-positive Zellen der Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäuse in verschiedenen experimentellen Ansätzen (Abbildung 19 und Abbildung 21) vergleichbar große Subpopulationen von α -Gustducin exprimierenden Zellen.

3.2.2 Analysen in Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen im Vergleich zu Kontrollen

Eine weitere Serie von Analysen der Bitterrezeptor-Expressionsmuster in Geschmacksrezeptorzellen wurde in einer Mauslinie vorgenommen, in welcher, aufgrund ihrer genetischen Veränderung, alle Tas2r131 exprimierenden Zellen zerstört (ablatiert) sind (Tas2r131^{+/BLiC/R26^{+/DTA}}, siehe 2.1.10.3 und 2.1.10.4, Seite 33). In diesen Mäusen wurde sowohl der Erfolg der Ablation der Tas2r131 exprimierenden Zellen, als auch die Expression anderer Bitterrezeptoren mit unterschiedlichen Methoden untersucht. Dabei wäre bei erfolgreicher Ablation eine Expression der anderen Tas2r-Gene nur dann zu erwarten, wenn sie außerhalb der Tas2r131-Zellpopulation vorkommt. Durch die Analyse mehrerer Tiere wurde überdies auf die Zufälligkeit der Expression geprüft.

3.2.2.1 Sensitivitätsanalyse für Endpunkt-PCR-Reaktionen zum Nachweis verschiedener Tas2r-mRNA

Zum Nachweis der mRNA-Expression verschiedener Tas2r sollten zunächst Endpunkt-RT-PCRs in den Tas2r131^{+/BLiC/R26^{+/DTA}}-Mäusen durchgeführt werden. Für die dazu optimierten spezifischen PCR-Reaktionen wurden zunächst die jeweiligen Sensitivitäten bestimmt, um zu gewährleisten, dass vergleichbare Mengen spezifischer cDNA-Sequenzen in den eingesetzten Proben detektiert werden könnten. Dazu wurden Tas2r-Matrizen unterschiedlicher Konzentrationen in die PCR-Nachweise eingesetzt. Genauer gesagt wurden Kopien-Zahlen imitiert, indem genomische DNA in Äquivalenten zur Gesamtgenomkonzentration einer Maus als Matrize eingesetzt wurde (siehe Abbildung 23a). Dabei kann davon ausgegangen werden, dass in einer Menge von einem Genomäquivalent theoretisch zwei Kopien eines jeden Gens vorliegen müssten.

Die Ergebnisse der durchgeführten PCR-Reaktionen sind in Abbildung 23b dargestellt. Es wird deutlich, dass alle Tas2r-PCR-Fragmente ab einer Matrizenmenge von 100 Genomäquivalenten nachweisbar sind. Tas2r109-, Tas2r119-, Tas2r138-, Tas2r140-, Tas2r143- oder Tas2r144-Sequenzen sind in den RT-PCR-Reaktionen schon aus einer Menge von 30 Genomäquivalenten nachweisbar. Sequenzen der Bitterrezeptoren Tas2r105, Tas2r118 und Tas2r131 sind sogar schon aus 10 Genomäquivalenten deutlich amplifizierbar. Der Nachweis der Tas2r102-Sequenz aus einer Matrizenmenge

von nur 3 Genomäquivalenten (Abbildung 23b, oberes Gelbild) stellt dabei höchstwahrscheinlich eine Zufälligkeit dar.

Somit ist für alle RT-PCR-Reaktionen eine eindeutige Amplifizierbarkeit aus 60–200 Matrizen-DNA-Sequenzen gewährleistet. Diese PCR-Reaktionen zum Tas2r-Sequenz-Nachweis sind damit für die weiteren Analysen annähernd vergleichbar. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass, wenn äußerst geringe mRNA-Kopienzahlen im Matrizen-Gemisch vorlägen (≤ 60 – ≤ 200), wohlmöglich keine Expression mittels dieser Methode nachgewiesen werden könnte.

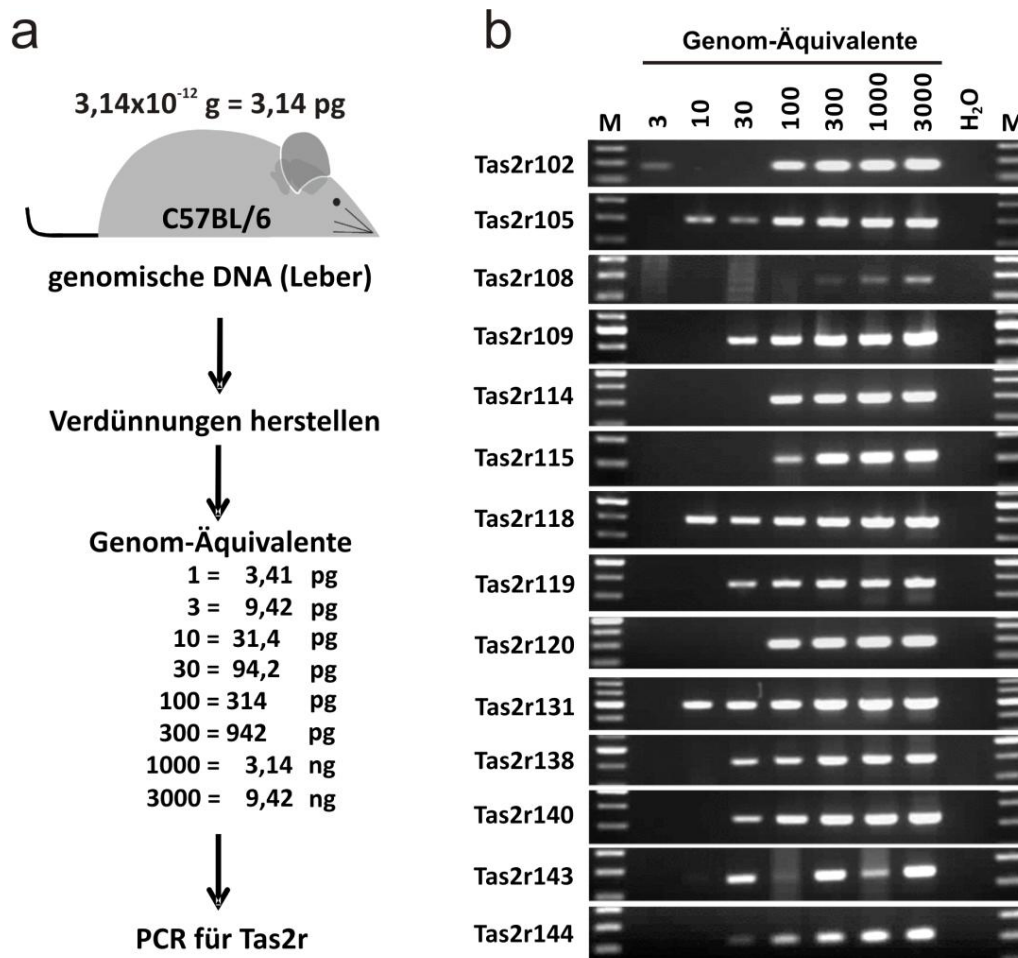


Abbildung 23: Sensitivität für Bitterrezeptor-Endpunkt-RT-PCR-Reaktionen. a) Schematische Darstellung zur Berechnung und Herstellung von Genomäquivalenten entsprechender Matrizen-DNA aus C57BL/6-Mauslebergewebe. Die Verdünnungen wurden in RNase-/DNase-freiem Wasser hergestellt. b) Endpunkt-PCRs mit 40 Zyklen wurden zum Nachweis von 14 verschiedenen Tas2r-Sequenzen durchgeführt. Dabei wurden als Matrizen genomische DNA verschiedener Konzentrationen, welche Äquivalente zur DNA-Menge eines Mausgenoms darstellen, eingesetzt. 1,5%ige Agarosegel-Bilder zeigen, dass für alle PCRs ein Nachweis aus einer Matrizenmenge von 100 Genomäquivalenten durchführbar ist. Tas2r109, Tas2r119, Tas2r138, Tas2r140, Tas2r143 und Tas2r144 sind ab 30; Tas2r105, Tas2r118 und Tas2r131 ab 10 Genomäquivalenten nachweisbar.

M = Marker (*GeneRuler™ DNA Ladder Mix*).

3.2.2.2 Nachweis der mRNA ausgewählter Tas2r in Zungengewebe von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen

Die bisherigen Versuche (Abbildung 21) ergaben einen Hinweis auf Bitterzellen, die kein Tas2r131 aufweisen und somit auf separate Bitterzellpopulationen. Wenn dies tatsächlich der Fall ist, sollte eine Zerstörung der gesamten Tas2r131 exprimierenden Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation nicht zum vollständigen Verlust von Tas2r exprimierenden Zellen führen. Um zu überprüfen, ob in Tieren, in denen alle Tas2r131 exprimierenden Zellen genetisch ablatiert sind, überhaupt noch mRNA anderer Bitterrezeptoren nachweisbar ist, wurden zunächst Endpunkt-RT-PCRs für ausgewählte Tas2r (siehe Abbildung 23) durchgeführt. Dabei wurde mit Wall- und Blätterpapillen angereichertes (VP+FoP) Zungenepithel von je drei Tieren mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/*BLiC*}/R26^{+/*DTA*}) und je zwei Kontrollgruppentieren (Tas2r131^{+/*+*}/R26^{+/*DTA*}, Tas2r131^{+/*BLiC*}/R26^{+/*+*}), in denen eine normale Tas2r-Expression zu erwarten wäre, untersucht. Außerdem wurde innerhalb dieser Experimente ein Tas2r131-*knock-out*-Tier (Tas2r131^{*BLiG/BLiG*}) mitgeführt, um zu bestätigen, dass das Fehlen der Tas2r131-kodierenden Gensequenz selbst einen Einfluss auf die Expression anderer Tas2r-Gene hat. Darüber hinaus wurde für alle Genotypen die Expression derselben mRNA-Sequenzen im nichtgustatorischen Zungenepithel, d. h. Epithel ohne Geschmackspapillen, analysiert.

In Abbildung 24 wird deutlich, dass in allen untersuchten Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation keine mRNA-Expression von Tas2r120, von Tas2r131 selbst, von Tas2r140 und Tas2r144 nachweisbar ist. Die meisten untersuchten Tas2r-mRNAs jedoch werden – trotz der Tas2r131-Zellablation – in diesen Tieren immer noch exprimiert, was auf eine Tas2r131-Zell-unabhängige Expression dieser Bitterrezeptor-Gene hindeutet. Dabei existieren Rezeptorsequenzen (Tas2r109, Tas2r114, Tas2r115, Tas2r119), die mittels RT-PCR immer eindeutig schwächer, als in den Kontrollgruppen nachweisbar sind, was ein Hinweis auf deren teilweise Ko-Expression mit Tas2r131 darstellt. Wiederum erscheinen RT-PCR-Banden zum Nachweis anderer Tas2r-mRNA-Sequenzen (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r108, Tas2r118, Tas2r138 und Tas2r143) in allen drei Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation eine ähnlich starke Expression dieser Rezeptor-Gene wie in den Kontrollgruppentieren aufzuzeigen. Dies könnte ein Hinweis auf deren komplett Tas2r131-Zell-unabhängige Expression sein. Ebenfalls ist mRNA von α -Gustducin in allen Tiergruppen in VP+FoP-Zungenepithel gut nachweisbar, nicht jedoch im Zungenepithel, welches keine Geschmackspapillen enthält. Darüber hinaus wird deutlich, dass sich die drei unabhängigen Tiere mit Tas2r131-Zellablation immer vergleichbar bezüglich der Expression verschiedener Bitterrezeptoren verhalten. Ein weiterer Befund ist, dass sowohl Tas2r108-, als auch Tas2r143-mRNA auch in diesen Mauslinien (Vergleich mit C57BL/6, Abbildung 16, Seite 76) in nichtgustatorischem Zungenepithel nachweisbar sind, was eine Expression dieser Bitterrezeptoren außerhalb der Geschmackspapillen bestätigt. Alle anderen untersuchten Tas2r-Sequenzen konnten dort nicht nachgewiesen werden. (Abbildung 24, unter „Zungenepithel ohne Papillen“)

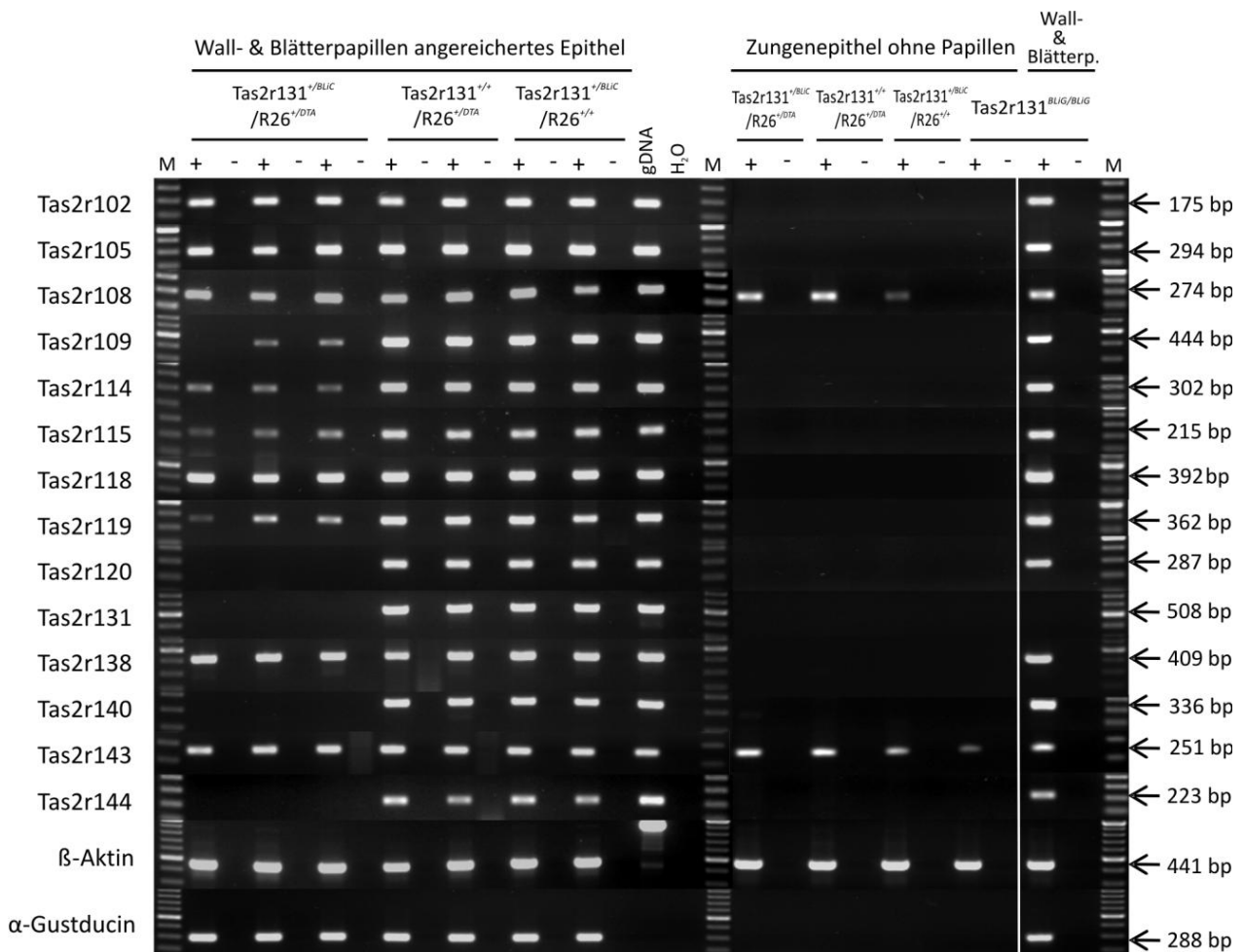


Abbildung 24: Nachweis der mRNAs ausgewählter Tas2r, sowie α-Gustducin und β-Aktin in Zungenewebe von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen im Vergleich zu Kontrollen. Nach RNA-Isolation (2.2.3.2, Seite 41) aus gustatorischem (Wall- und Blätterpapillen angereichert) sowie nichtgustatorischem Zungenepithel (Zungenepithel ohne Geschmackspapillen) folgte eine cDNA-Synthese (2.2.3.3, Seite 42) unter Verwendung einer Reversen Transkriptase (+), oder unter Weglassen der Reversen Transkriptase (-) als Kontrolle für Verunreinigungen durch genomische DNA. Endpunkt-RT-PCRs mit 40 Zyklen wurden zum Nachweis von 14 Tas2r-mRNAs, sowie β-Aktin und α-Gustducin durchgeführt. Dabei wurden bei β-Aktin und α-Gustducin Intron-überspannende Primer-Paare benutzt, sodass mit genomischer DNA als Matrice für β-Aktin eine PCR-Bande von 895 bp und für α-Gustducin keine PCR-Bande (theoretisch 4065 bp) unter den gegebenen Bedingungen erscheint. Alle anderen PCR-Produkt-Längen aus genomischer DNA entsprechen denen der cDNA und sind rechts neben den Gelbildern angegeben. Für 1,5%ige Agarosegel-Bilder zeigen – mit Ausnahme von Tas2r131 – RT-PCR-Produkte für alle analysierten Gene im homozygoten Tas2r131-knock-out-Tier (Tas2r131^{BLiG/BLiG}). Für Tas2r131, Tas2r120 und Tas2r144 wurden keine PCR-Produkte in drei unabhängigen Mäusen mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation (Tas2r131^{+BLiC}/R26^{+DTA}) detektiert; schwache Banden waren hingegen für Tas2r109, Tas2r114, Tas2r115 und Tas2r119 zu sehen. Für Tas2r102, Tas2r105, Tas2r108, Tas2r118, Tas2r138 und Tas2r143 erschienen die Banden der PCR-Produkte gleich stark wie die der Kontrollgruppen (Tas2r131^{+/+}/R26^{+DTA}, Tas2r131^{+BLiC}/R26^{+/+}). Darüber hinaus konnte in je zwei Tieren der beiden Kontrollgruppen eine Expression aller analysierten Gene detektiert werden. In nichtgustatorischem Gewebe wurde keine Expression für α-Gustducin, einem geschmacksrezeptorzellspezifischem Gen, gefunden. Mit Ausnahme von Tas2r108 und Tas2r143, wurden dort auch keine PCR-Produkte für Bitterrezeptor-mRNAs detektiert.

In VP+FoP-Zungenepithel des Tas2r131-*knock-outs* (Tas2r131^{BLiG/BLiG}) können alle untersuchten mRNA-Sequenzen detektiert werden, außer die Sequenz von Tas2r131 selbst.

Somit ist es möglich hier mittels Endpunkt-RT-PCR in Tieren mit Tas2r131-Zellablation, mRNA-Sequenzen für die gleichen Bitterrezeptoren (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r138) nachzuweisen, die in den Tieren mit Tas2r131-Reporterprotein außerhalb der hrGFP exprimierenden Zellen zu finden waren. Ferner scheinen Tas2r108-, Tas2r109-, Tas2r114-, Tas2r119- und Tas2r143-mRNA zu unterschiedlichen Anteilen außerhalb der Tas2r131 exprimierenden Zellen aufzutreten. Dagegen ist keine Tas2r120-mRNA mittels Endpunkt-RT-PCR in VP+FoP-Epithel von Tieren mit ablatierten Tas2r131-Zellen nachweisbar. Zuvor war mittels *ISH* in Wallpapillen-Gewebschnitten diese mRNA auch nur innerhalb der hrGFP(Tas2r131)-Zellen detektierbar. Überdies scheinen laut Endpunkt-RT-PCR Tas2r140- und Tas2r144-mRNA-Sequenzen ebenfalls innerhalb der Tas2r131-Zellpopulation exprimiert zu sein.

3.2.2.3 Quantitative mRNA-Analyse der Tas2r in Zungengewebe von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass aus dem mRNA-Expressionslevel in mit Wall- und Blätterpapillen (VP+FoP) angereichertem Zungenepithel von Mäusen mit Tas2r131-Zellablation Rückschlüsse auf die Ko-Expression der Bitterrezeptoren innerhalb der Geschmacksrezeptorzellen möglich sind. Um genauer zu beleuchten, wie stark der Überlappungsgrad der Bitterrezeptor-mRNA exprimierenden Zellen ist, sollten daher auch quantitative mRNA-Expressionsanalysen in diesen Geweben durchgeführt werden. So wurden mittels *Real-Time-PCRs* die Bitterrezeptor-Expressionslevel in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Zungenepithel von Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) im Vergleich zu Kontrolltieren (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}, Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/+}) bestimmt.

Dabei wurde zunächst dasselbe Tas2r-Set, welches vorher in Endpunkt-RT-PCRs (siehe Abbildung 24) analysiert worden war, mit Ausnahme der bereits in nichtgustatorischem Epithel nachgewiesenen Rezeptoren Tas2r108 und Tas2r143, dagegen zusätzlich Tas2r104, genauer untersucht. Als Referenzgen für die relative Bestimmung der Expressionslevel diente *β-Aktin*.

In Abbildung 25 sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die Tiere mit ablatierten Tas2r131 exprimierenden Zellen geringere Tas2r-mRNA-Expressionslevel zeigen, als die Kontrollgruppentiere (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA} und Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/+}). Diese Werte reichen von einer nicht-messbaren Expression (z. B. für Tas2r144, = 0), über eine 0,01-fache, d. h. kaum nachweisbare, Expression (z. B. für Tas2r131), bis hin zu einer rund 0,4-fachen Expression (z. B. für Tas2r118) in den Tieren mit Ablation im Vergleich zu den Kontrolltieren (alle genauen Werte – siehe Tabelle 39, Mittelwert $2^{-\Delta\Delta C_T}$). Dabei bestätigt die annähernd ausgelöschte mRNA-Expression von Tas2r131, dass die Ablation der Tas2r131 exprimierenden Zellen funktioniert. Eine

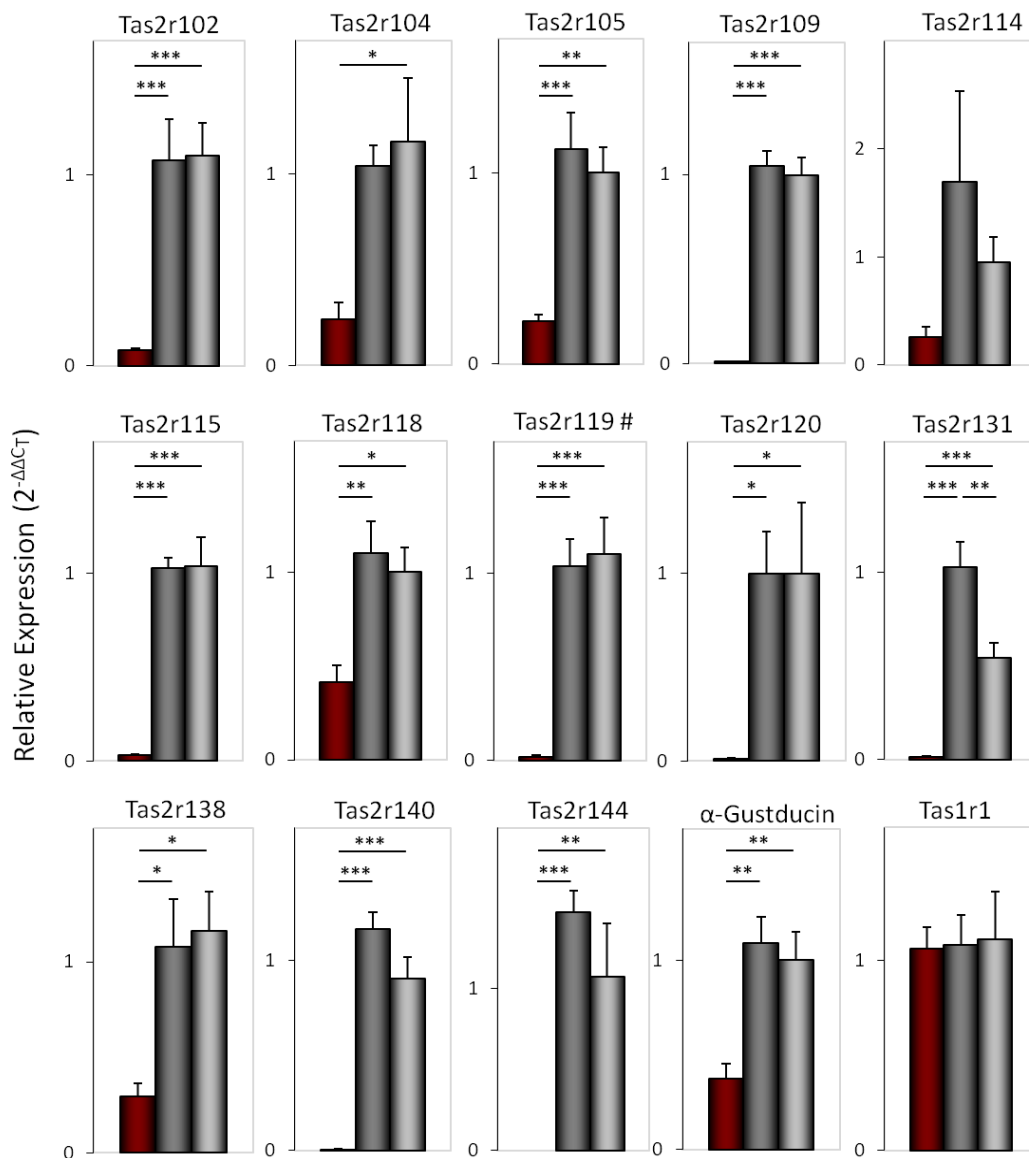


Abbildung 25: Relative mRNA-Expressionslevel ausgewählter Tas2r, α -Gustducin und Tas1r1. Nach RNA-Isolation (2.2.3.2, Seite 41) aus mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Gewebe folgte eine cDNA-Synthese (2.2.3.3, Seite 42). Quantitative *Real-Time*-RT-PCRs mit 40 Zyklen wurden zum Nachweis von 13 verschiedenen Tas2r-mRNAs, sowie von α -Gustducin und Tas1r1 durchgeführt. Dabei wurde β -Aktin als Referenz zur relativen Bestimmung der Expression benutzt. Eine Normierung erfolgte weiterhin auf den Mittelwert aller Kontrolltiere (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA} [dunkelgraue Säulen], Tas2r131^{+/BLIC}/R26^{+/+} [hellgraue Säulen]), welche somit gemittelt als Referenzgruppe dienten (Seite 46). Zur Untersuchung der relativen Expression von Tas2r131 diente ausschließlich Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA} als Referenzgruppe. Im Vergleich zu dieser ist eine ca. 0,5-fache Expression der Gruppe Tas2r131^{+/BLIC}/R26^{+/+}, und eine etwa 0,01-fache Expression der Tiergruppe mit ablatierten Tas2r131 exprimierenden Zellen (Tas2r131^{+/BLIC}/R26^{+/DTA} [rote Säulen]) nachzuweisen. Für alle anderen untersuchten Gene sind keine signifikanten Unterschiede der Expressionslevel beider Kontrollgruppen nachzuweisen. Alle hier untersuchten Tas2r-Sequenzen zeigen ein deutlich verringertes Expressionslevel in Tieren mit ablatierten Tas2r131-Zellen im Vergleich zu den Referenztiergruppen (z. B. keine nachweisbare Expression für Tas2r144 bis hin zu $\sim 0,4$ -facher Expression für Tas2r118). Die Tas1r1-mRNA-Expression ist in der Tiergruppe mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation im Vergleich zu den Referenzgruppen nicht signifikant verändert. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse (Mittelwertvergleich der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Werte aller Gruppen) erfolgte mittels Einfaktorieller ANOVA, gefolgt von einem *POST-HOC*-Test (*Bonferroni*), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; $n = 5-6$ Tiere pro Gruppe. (# Tas2r119-qRT-PCR-Assay, detektiert auch Tas2r117-mRNA zu 99% mit.)

3 Ergebnisse

komplett ausgelöschte Expression von Tas2r131 wäre dagegen nur in Tas2r131-*knock-out*-Tieren unbedingt zu erwarten (bereits analysiert – siehe Abbildung 20, Seite 84).

Auch in diesen Experimenten wird wieder deutlich, dass alle Tiere mit einer Ablation der Tas2r131-Zellen untereinander vergleichbare Expressionslevel für dieselben Bitterrezeptoren aufweisen (siehe auch SE in Tabelle 39).

Außerdem lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Expressionsstärken der untersuchten Gene zwischen beiden genutzten Kontrolltiergruppen feststellen (Tabelle 39, letzte Spalte). Lediglich für Tas2r131 selbst zeigt Kontrolltiergruppe Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}, welche sich durch einen heterozygoten *Knock-out* des genkodierenden Tas2r131-Locus auszeichnet, eine etwa 0,5-fache mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe Tas2r131^{+/+/R26^{+/DTA}}, in der der Bitterrezeptor Tas2r131 von zwei Allelen exprimiert wird.

Die spezifisch in Geschmacksrezeptorzellen exprimierte G-Protein-kodierende α -Gustducin-mRNA weist ein ca. 0,4-faches Expressionslevel in Tieren mit ablatierten Tas2r131 exprimierenden Zellen gegenüber den Kontrolltieren auf. Dagegen ist für die Tas1r1-mRNA-Expression kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen zu sehen. D. h., die Ablation der Tas2r131-Zellpopulation scheint, wie zu erwarten, keine Auswirkungen auf die Tas1r1-Expression zu haben (letztes Feld – Abbildung 25, letzte Zeile – Tabelle 39).

Tabelle 39: Werte der Relativen mRNA-Expression von Tas2r, α -Gustducin und Tas1r1 in Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation bezogen zu Kontrolltieren.

Untersuchtes Gen	Relative (n-fache) Expression in Tas2r131 ^{+/BLiC} /R26 ^{+/DTA}		Signifikanzwert (p-Wert) nach <i>Post-Hoc</i> -Test (<i>Bonferroni</i>)		
	Mittelwert $2^{-\Delta\Delta C_T}$	\pm SE	Tas2r131 ^{+/BLiC} /R26 ^{+/DTA} versus Tas2r131 ^{+/+/R26^{+/DTA}}	Tas2r131 ^{+/BLiC} /R26 ^{+/DTA} versus Tas2r131 ^{+/+/R26^{+/DTA}}	Tas2r131 ^{+/+/R26^{+/DTA}} versus Tas2r131 ^{+/+/R26^{+/DTA}}
Tas2r102	0,0850	0,0094	0,0014	0,0012	1,0000
Tas2r104	0,2417	0,0849	0,1295	0,0106	0,6938
Tas2r105	0,2220	0,0353	0,0008	0,0030	1,0000
Tas2r109	0,0106	0,0021	<0,0001	<0,0001	1,0000
Tas2r114	0,2546	0,1025	0,1424	0,9392	0,8856
Tas2r115	0,0314	0,0059	<0,0001	<0,0001	1,0000
Tas2r118	0,4134	0,0925	0,0076	0,0218	1,0000
Tas2r119 #	0,0200	0,0072	0,0004	0,0002	1,0000
Tas2r120	0,0106	0,0044	0,0153	0,0168	1,0000
Tas2r131	0,0136	0,0082	<0,0001	0,0012	0,0036
Tas2r138	0,2938	0,0719	0,0340	0,0182	1,0000
Tas2r140	0,0052	0,0052	<0,0001	<0,0001	0,1146
Tas2r144	0	0	0,0003	0,0030	0,4859
α -Gustducin	0,3771	0,0775	0,0033	0,0092	1,0000
Tas1r1	1,0617	0,1126	1,0000	1,0000	1,0000

n pro Gruppe \geq 5, Signifikanztest: nach Einfaktorieller ANOVA, *Bonferroni-Post-Hoc*-Test

Nach der Erkenntnis, dass (außer für Tas2r131) keine signifikanten Unterschiede in der Tas2r-mRNA-Expression zwischen beiden Kontrolltiergruppen bestehen, wurden weitere Experimente zur Analyse der Bitterrezeptor-Expression in Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation lediglich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Tas2r131^{+/+}/R26^{+ /DTA}), in welcher der Bitterrezeptor Tas2r131 von zwei Allelen exprimiert wird, durchgeführt. Ziel war es dabei, alle Tas2r-mRNA-Expressionslevel zu analysieren, damit geschlussfolgert werden kann, inwiefern es Muster von Tas2r exprimierenden Zellen, charakterisiert durch die Expression von immer denselben Bitterrezeptoren, gibt, und wie stark deren wohlmögliche Überlappung ist.

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse dieser Analysen in VP+FoP-Gewebe graphisch dargestellt. Die genauen dazugehörigen $2^{-\Delta C_T}$ -Werte mit Standardfehlern sind in Tabelle 40 gezeigt. Außerdem wurde mittels *t*-Test auf signifikante Unterschiede dieser Werte beider Gruppen getestet. Die *p*-Werte, sowie die Differenz aus Kontrollgruppen- $2^{-\Delta C_T}$ -Werten minus der $2^{-\Delta C_T}$ -Werte der Tiere mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation sind ebenfalls in Tabelle 40 zu finden. Um den Vergleich der Expressionslevel der verschiedenen Rezeptoren untereinander zu gewährleisten, wurde bei der Berechnung der in Abbildung 26 und Tabelle 40 dargestellten Werte, ausschließlich auf β -Aktin normalisiert. Somit sind in der Kontrolltiergruppe auch relative Expressionsunterschiede von Bitterrezeptoren untereinander zu beobachten. Die Relationen dieser unterschiedlichen Expressionslevel sind vergleichbar mit den Ergebnissen der Analysen in C57BL/6-Mäusen (siehe Abbildung 14, Seite 73). In Mäusen mit Tas2r131-Zellablation sind im Vergleich zu den Kontrolltieren beinahe alle Tas2r-mRNA-Expressionslevel zu verschiedenen Ausmaßen signifikant reduziert (siehe Abbildung 26 und Tabelle 40, letzte Spalte).

Ausnahmen davon bilden Tas2r114, Tas2r124, Tas2r126, Tas2r134, Tas2r136 und Tas2r143:

Mit einer relativen Expression ($2^{-\Delta C_T}$) von 0,0043 ($\pm 0,0004$) in Tieren mit ablatierten Tas2r131-Zellen und 0,0042 ($\pm 0,0007$) in Kontrolltieren ist die Abweichung des mittleren Tas2r126-mRNA-Expressionslevels von -4,3% nicht signifikant ($p = 0,84$). Das Tas2r134-mRNA-Expressionslevel beträgt in VP+FoP-Zungenepithel von Tieren mit Tas2r131-Zellablation 0,0010 ($\pm 0,0006$), von Kontrolltieren 0,0013 ($\pm 0,0003$). Damit ist in den Tieren mit Ablation diese Expression durchschnittlich um 34,3% reduziert. Dieser Unterschied ist jedoch laut *t*-Test nicht signifikant ($p = 0,527$). Für Tas2r143-mRNA ist die mittlere Expression in Tieren mit Tas2r131-Zellablation ($0,0061 \pm 0,0002$) gegenüber der mittleren Expression in Kontrollmäusen ($0,0009 \pm 0,0001$) sogar im Mittel um 83% erhöht ($p = 0,015$).

Für Tas2r114, Tas2r124 und Tas2r136 sind die Reduktionen der mittleren $2^{-\Delta C_T}$ -Werte in Tieren mit Tas2r131-Zellablation gegenüber den mittleren $2^{-\Delta C_T}$ -Werten in Kontrollmäusen zwar deutlich (siehe Abbildung 26), jedoch scheinen die individuellen Standardfehler innerhalb der Gruppen zu hoch, sodass deshalb keine Signifikanzen feststellbar sind (siehe Tabelle 40).

3 Ergebnisse

Tabelle 40: Werte der relativen mRNA-Expression der Tas2r, α -Gustducin und Tas1r1 in Tieren mit ablatierten Tas2r131-Zellen und Kontrolltieren, sowie deren Differenz.

Untersuchtes Gen	Relative Expression zu β -Aktin in Tas2r131 ^{+/+} /R26 ^{+/-DTA}		Relative (n-fache) Expression in Tas2r131 ^{+/BLiC} /R26 ^{+/-DTA}		Signifikanzwert (p-Wert) nach t-Test Tas2r131 ^{+/BLiC} /R26 ^{+/-DTA} versus Tas2r131 ^{+/+} /R26 ^{+/-DTA}	Veränderung der $\bar{\mu}$ Expressionslevel in %
	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE	Mittelwert $2^{-\Delta CT}$	\pm SE		
Tas2r102	0,0018	0,0004	0,0001	<0,0001	0,006	-92,1
Tas2r103	0,0010	0,0001	0	0	<0,001	-100,0
Tas2r104	0,0035	0,0003	0,0013	0,0004	0,003	-62,2
Tas2r105	0,0035	0,0006	0,0007	0,0001	0,005	-80,3
Tas2r106	0,0026	0,0004	0,0008	0,0002	0,007	-69,6
Tas2r107	0,0010	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,001	-97,6
Tas2r108	0,0053	0,0004	0,0024	0,0004	<0,001	-54,8
Tas2r109	0,0005	0,0001	0	<0,0001	0,003	-100,0
Tas2r110	0,0017	0,0002	<0,0001	<0,0001	<0,001	-99,4
Tas2r113	0,0016	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,009	-97,2
Tas2r114	0,0005	0,0002	0,0001	<0,0001	0,077	-89,2
Tas2r115	0,0004	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001	-96,9
Tas2r116	0,0038	0,0008	0,0001	<0,0001	0,006	-98,3
Tas2r117	0,0024	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,001	-99,9
Tas2r118	0,0098	0,0015	0,0037	0,0008	0,008	-62,5
Tas2r119	0,0019	0,0003	<0,0001	<0,0001	0,001	-97,7
Tas2r120	0,0024	0,0004	<0,0001	<0,0001	0,003	-99,1
Tas2r121	0,0020	0,0002	0,0001	<0,0001	<0,001	-97,0
Tas2r122	0,0002	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,014	-95,8
Tas2r123	0,0010	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001	-99,5
Tas2r124	0,0007	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,461	-94,3
Tas2r125	0,0013	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,003	-97,7
Tas2r126	0,0042	0,0007	0,0043	0,0004	0,840	+4,3
Tas2r129	0,0012	0,0002	<0,0001	<0,0001	0,001	-98,8
Tas2r130	0,0012	0,0002	0,0001	<0,0001	0,006	-88,9
Tas2r131	0,0022	0,0009	<0,0001	<0,0001	0,055	-99,2
Tas2r134	0,0013	0,0003	0,0010	0,0006	0,527	-34,3
Tas2r135	0,0042	0,0002	0,0028	0,0004	0,026	-33,5
Tas2r136	0,0004	0,0001	<0,0001	<0,0001	0,072	-95,8
Tas2r137	0,0047	0,0008	0,0023	0,0003	0,029	-51,4
Tas2r138	0,0044	0,0010	0,0012	0,0003	0,024	-72,7
Tas2r139	0,0030	0,0003	0,0012	0,0002	0,001	-60,7
Tas2r140	0,0007	0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001	-99,0
Tas2r143	0,0009	0,0001	0,0016	0,0002	0,015	+83,0
Tas2r144	0,0003	<0,0001	0	0	<0,001	-100,0
α -Gustducin	0,0591	0,0075	0,0205	0,0041	0,002	-65,4
Tas1r1	0,0008	0,0001	0,0008	0,0001	0,919	-1,9
Tas1r2	0,0106	0,0028	0,0109	0,0018	0,933	+2,7
Tas1r3	0,0078	0,0013	0,0101	0,0017	0,331	+29,0

n pro Gruppe \geq 5; Signifikanztest: nach Einfaktorieller ANOVA, t-Test

Die α -Gustducin-mRNA-Expression in Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen ist mit 65,5% signifikant (p 0,002) gegenüber den Kontrolltieren reduziert. Alle Tas1r-mRNA-Expressionlevel hingegen sind nicht bis kaum verringert (1,9%–29,0%). Und diese geringen Abweichungen der Expressionslevel gegenüber den Kontrollmäusen sind auch nicht signifikant.

Diese Experimente zeigten, dass, wenn man Bittergeschmacksrezeptorzellen zerstört, welche einen bestimmten Bitterrezeptor (Tas2r131) exprimieren, trotzdem noch mRNA anderer Bittergeschmacksrezeptoren exprimiert wird. Die meisten der anderen Tas2r-mRNA-Expressionslevel sind dabei jedoch stark bis moderat reduziert. Dies spricht für eine relativ große Überlappung von unterschiedlichen Tas2r-mRNA exprimierenden Zellpopulationen. Deutlich wird auch, dass diese überlappende mRNA-Expression innerhalb der verschiedenen Bittergeschmacksrezeptorzellen in festen Mustern auftritt, denn diese ist in unterschiedlichen Tieren vergleichbar. Aber welchen Regeln unterliegen die beobachteten Ko-Expressionsmuster der Bitterrezeptoren?

Zur weiteren möglichen Interpretation der erhaltenen Ergebnisse wurde eine Analyse der chromosomalen Lage aller 35 Tas2r-kodierenden Gensequenzen durchgeführt. Dazu wurde die Referenz-Sequenz des C57BL/6-Mausstammes (GRCm38.p1 C57BL6/J) aus der *NCBI*-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) genutzt. Die dabei verwendeten Referenz-Sequenz-Annotationen sind für Chromosom 2, NC_000068.7; für Chromosom 6, NC_000072.6; und für Chromosom 15, NC_000081.6. Aus den erhaltenen Daten zur Lage der Protein-kodierenden Sequenzen der Tas2r-Gene wurde dann Abbildung 4 (siehe Einleitung, Seite 15) erstellt. Diese veranschaulicht zunächst, dass es nur eine Protein-kodierende Tas2r-Sequenz gibt, die auf Chromosom 2 lokalisiert ist (Tas2r134). Auch ist auf Chromosom 15 nur die Tas2r119-Protein-kodierende Sequenz zu finden. Alle anderen für funktionelle Bitterrezeptoren-kodierende Tas2r-Sequenzen sind auf Chromosom 6 lokalisiert, wo sie mehrere Cluster (Anhäufungen, Gruppen) bilden. Tas2r118 ist mit rund 16 Mb Entfernung von den nächsten Bitterrezeptorsequenzen entfernt lokalisiert. Danach liegen, bei rund 40,5 Mb Tas2r137 und Tas2r108 direkt nebeneinander, bei etwa 40,6 Mb folgt die Sequenz von Tas2r138, die aber in entgegengesetzter Richtung vom Chromosom 2 transkribiert wird. Die kodierenden Sequenzen für Tas2r139, Tas2r144, Tas2r143, Tas2r135 und Tas2r126 liegen im Bereich von 42,1-42,5 Mb auf Chromosom 6 und besitzen die gleiche Transkriptionsrichtung. Tas2r130-, Tas2r107-, Tas2r106-, Tas2r104-, Tas2r105- und Tas2r114-kodierende Sequenzen liegen im Bereich von 131,6 Mb-131,7 Mb und werden auch alle in gleicher Richtung transkribiert. Alle noch übrigen Sequenzen, die für Bitterrezeptoren kodieren (siehe Abbildung 4) liegen auf Chromosom 6 im Abschnitt von 132,7 Mb-133,1 Mb und werden teils in unterschiedliche Richtungen transkribiert.

Werden die erhaltenen Ergebnisse aus den quantitativen RT-PCR-Analysen zur Expression der Tas2r-mRNA-Sequenzen in Wall und Blätterpapillengewebe nun nach dieser chromosomalen Lage der *Tas2r* aus Abbildung 4 geordnet, ergibt sich die Aufstellung, welche in Abbildung 26 dargestellt ist.

3 Ergebnisse

Tas2r119, dessen Sequenz auf Chromosom 15 lokalisiert ist, ist mit 97,7% signifikant weniger in Tieren mit *Tas2r131*-Zellablation exprimiert, als in Kontrolltieren (siehe Tabelle 40). D. h., *Tas2r119*-mRNA ist scheinbar häufig in *Tas2r131* exprimierenden Zellen ko-exprimiert. Dagegen ist nach *Tas2r131*-Zellablation das mRNA-Expressionslevel von *Tas2r134*, dessen kodierende Sequenz auf Chromosom 2 zu finden ist, nicht signifikant verändert. Diese beiden Rezeptoren scheinen daher unabhängig voneinander exprimiert zu werden und wurden in Abbildung 26 rechts neben allen anderen *Tas2r*-mRNA-Expressionsergebnissen dargestellt.

Viele der Bitterrezeptoren (Abbildung 26: *Tas2r120*–*Tas2r140*), deren kodierende Sequenzen auf Chromosom 6 in der Nähe von *Tas2r131* lokalisiert sind, weisen nach *Tas2r131*-Zellablation drastisch reduzierte mRNA-Expressionslevel (92,1%–100%, Tabelle 40, Abbildung 26) in Papillengewebe auf. Sie verhalten sich also bezüglich ihrer Transkription untereinander ähnlich und werden scheinbar vornehmlich in *Tas2r131*-Zellen exprimiert, obwohl sie teilweise ungleiche Transkriptionsrichtungen besitzen.

Chromosomal entfernter gelegene *Tas2r* sind hingegen nach *Tas2r131*-Zellablation oft noch deutlich und demzufolge wahrscheinlich in anderen als den *Tas2r131*-Zellen exprimiert. Die *Tas2r118*-kodierende Sequenz ist z. B. auf Chromosom 6 bei rund 24 Mb lokalisiert (Abbildung 4). *Tas2r118*-mRNA wird mit 62,5% signifikant weniger in Tieren mit *Tas2r131*-Zellablation exprimiert, als in Kontrollen. Dem ähneln *Tas2r137*, *Tas2r108* und *Tas2r138*, deren Protein-kodierende Sequenzen zwar über 20 Mb von *Tas2r118* entfernt, aber untereinander relativ nah beieinander lokalisiert sind. Sie zeigen verringerte mRNA-Expressionslevel von 51,4%; 54,8% und 72,7% (Tabelle 40, Abbildung 26). *Tas2r139*-mRNA ist nach *Tas2r131*-Zellablation signifikant um 60,7% reduziert, dagegen ist die *Tas2r144*-mRNA-Expression zu 100% reduziert. Deren kodierenden Sequenzen sind ca. 0,2 Mb von den nächstfolgenden *Tas2r*-Sequenzen entfernt (Abbildung 4, Seite 15). Die chromosomal nah beieinander gelegenen *Tas2r*-kodierenden Sequenzen, *Tas2r143*, *Tas2r135* und *Tas2r126* (Abbildung 4), verhalten sich in ihrer mRNA-Expression recht ähnlich. Sie werden nämlich, wie früher angeführt, nach *Tas2r131*-Zellablation immer noch stark in VP+FoP-Epithel exprimiert und beinhalten die beiden Rezeptoren (*Tas2r126*, *Tas2r143*), deren mRNA-Level in Tieren mit *Tas2r131*-Zellablation nicht reduziert, sondern eher erhöht war. (Tabelle 40, Abbildung 26). Im nächsten chromosomalen Cluster liegen *Tas2r130*, *Tas2r107*, *Tas2r106*, *Tas2r104*, *Tas2r105* und *Tas2r114*. Auch die mRNA-Expressionslevel dieser Bitterrezeptor-Gene sind in Tieren mit ablatierten *Tas2r131*-Zellen untereinander vergleichbar reduziert (62,2%–89,2%; Ausnahme – *Tas2r107*: 97,6%; siehe Tabelle 40). (Abbildung 26)

Die mRNA-Expressionslevel der *Tas1r*-Sequenzen sind, wie bereits erwähnt, in Tieren mit Ablation im Vergleich zu den Kontrolltieren weitgehend unverändert (Tabelle 40, Abbildung 26). Deren kodierende Sequenzen sind übrigens auf Chromosom 4 lokalisiert, wobei *Tas1r1* und *Tas1r3* komplementär zu *Tas1r2* transkribiert werden (nicht dargestellt).

Das α -Gustducin-kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 5 (nicht gezeigt).

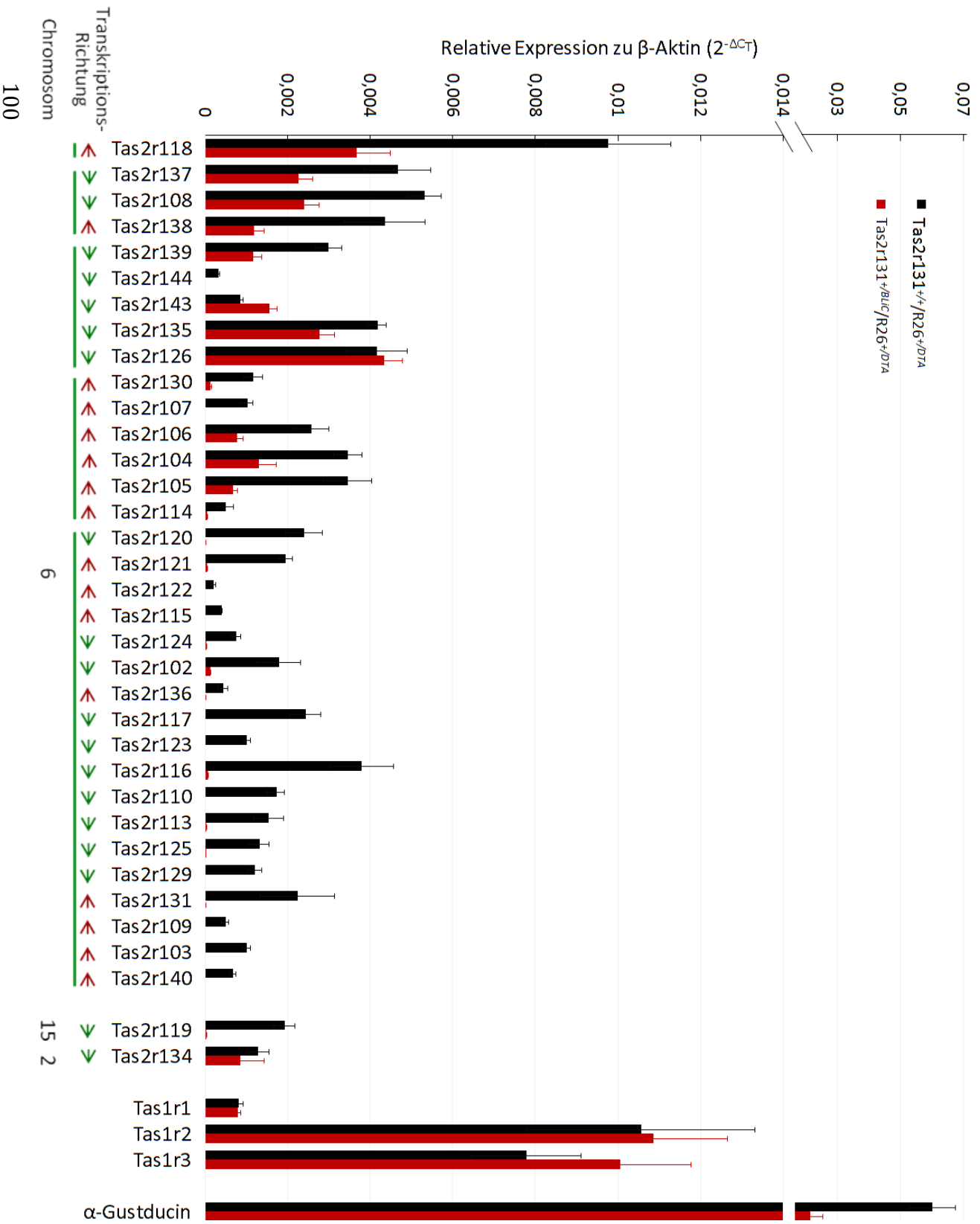


Abbildung 26: Relative mRNA-Expressionslevel aller Bitterrezeptoren, geordnet nach chromosomal Lage ihrer genkodierenden Sequenzen, sowie von α -Gustducin und den Tas1r-Rezeptor-Untereinheiten in VP+FQP-Epithel von Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation Tas2r131^{+/Bluc}/R26^{+/DTA}, rote Balken) im Vergleich zu Kontrolltieren (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}, schwarze Balken).

3.2.2.4 Zelluläre Tas2r-mRNA-Expression in der Wallpapille von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen mittels ISH

Laut den Analysen der Tas2r-mRNA-Expressionslevel im Gesamt-Wall- und Blätterpapillengewebe von C57BL/6- und Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen (3.1.3.1.3, Seite 76; Seite 93) und der Tas2r-mRNA-Expression in Wallpapillen-Geschmackszellen dieser Tiere (3.1.3.2, Seite 79; 3.2.1.3, Seite 85), zeigen schwächere mRNA-Expressionslevel eine seltenere Expression in einzelnen Zellen an, bzw. stärkere Expressionlevel eine häufigere Expression. Um diese Annahme zu stützen, wurden auch in Wallpapillen(VP)-Gewebeschnitten von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen ISH-Experimente durchgeführt, welche ferner Teil der im Rahmen dieser Doktorarbeit von mir geplanten und betreuten Bachelorarbeit von Julia Freydank (Freydank 2012) waren. So wurde vermutet, dass in den Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation zwar Bitterrezeptor-mRNAs, wie von Tas2r131 selbst, von Tas2r120 oder Tas2r102, nicht mehr oder kaum noch nachweisbar sein dürften. Doch mRNA-Sequenzen von Rezeptoren, deren mRNA-Expressionslevel in den qRT-PCRs nur moderat (Bsp. Tas2r105, Tas2r118 oder Tas2r138) oder gar nicht (Bsp. Tas2r126 oder Tas2r143) reduziert waren, müssten in vergleichbar vielen Zellen, wie in den Kontrolltieren zu finden sein.

Es wurden ISH-Experimente unter Verwendung von *antisense*-RNA-Sonden gegen Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r120, Tas2r126 Tas2r131, Tas2r138, Tas2r143 und α -Gustducin durchgeführt. Vergleichend mit vorangegangenen ISH-Experimenten in C57BL/6- und Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen (3.1.3.2, Seite 79; 3.2.1.3, Seite 85), sind somit hier Tas2r126 und Tas2r143 zur Analyse ergänzt wurden. Denn diese beiden Rezeptoren zeigten in den qRT-PCRs keine Reduktionen der mRNA-Expressionslevel in Mäusen mit Tas2r131-Zellablation. Zusätzlich zu den Mäusen mit Tas2r131-Zellablation (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) wurden als Kontrolltiere Mäuse ohne Tas2r131-Zellablation (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}) und homozygote Tas2r131-*knock-out*-Mäuse (Tas2r131^{BLiG/BLiG}) untersucht. In Abbildung 27 sind exemplarische Bilder von VP-Schnitten der untersuchten Tiere dargestellt.

In Tieren mit Tas2r131-Zellablation ist weder Tas2r131-, noch Tas2r120-mRNA nachweisbar (linke Bildreihe, Abbildung 27). Dies bestätigt erneut eine erfolgreiche Ablation der Tas2r131-Zellen und eine Ko-Expression von Tas2r120-mRNA in denselben Zellen. Außerdem sind wieder verschiedene Expressionshäufigkeiten für die anderen Tas2r-mRNA-Sequenzen oder α -Gustducin in diesen Tieren zu finden. Dabei scheint die Geschmacksknospengröße in den Tieren mit Tas2r131 Zellablation gegenüber den Kontrollen allerdings unverändert. In homozygoten Tas2r131-*knock-out*-Mäusen sind keine für Tas2r131-mRNA markierte Zellen zu finden, jedoch für alle anderen untersuchten Tas2r-Sequenzen existieren positive Zellen (rechte Bildreihe, Abbildung 27). Zur quantitativen Betrachtung wurden die markierten Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl mehrerer Geschmacksknospenquerschnitte von mindestens zwei unabhängigen Mäusen je Genotyp ausgezählt (Werte einzelner Tiere: siehe Anhang, Seite 166 – Tabelle 44; Mittelwerte: Abbildung 28a).

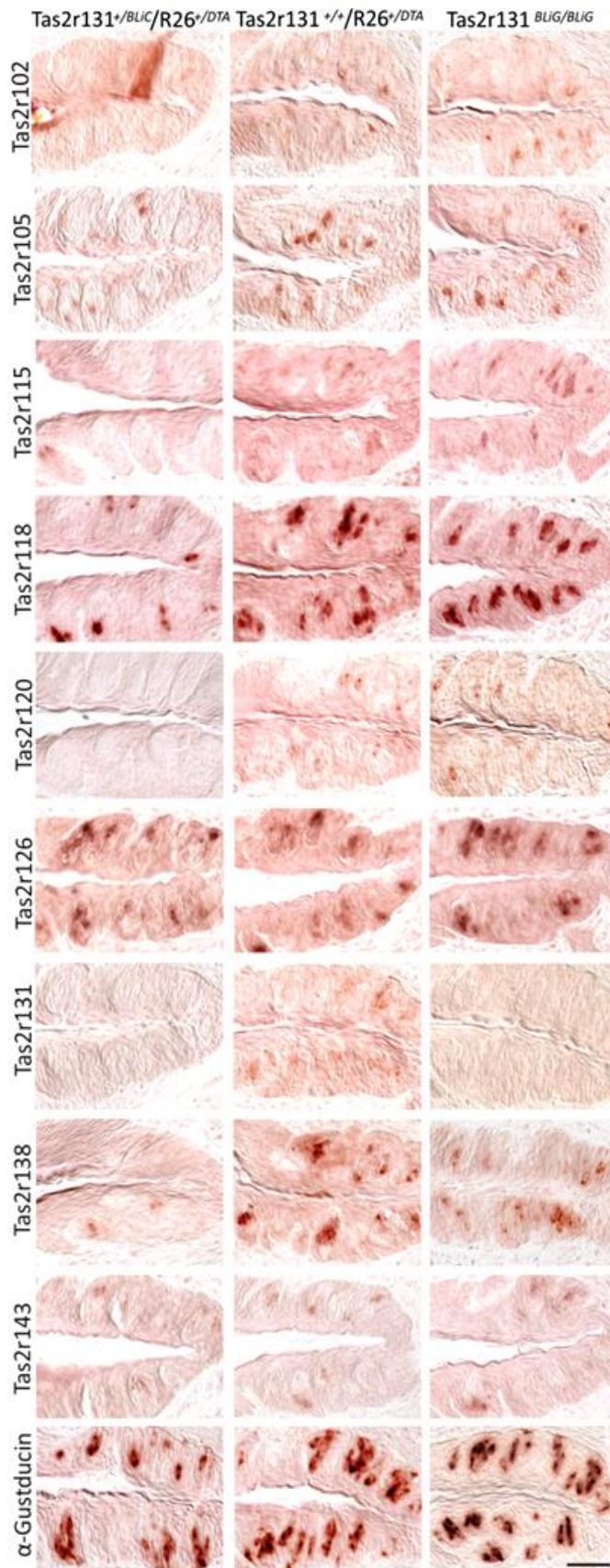
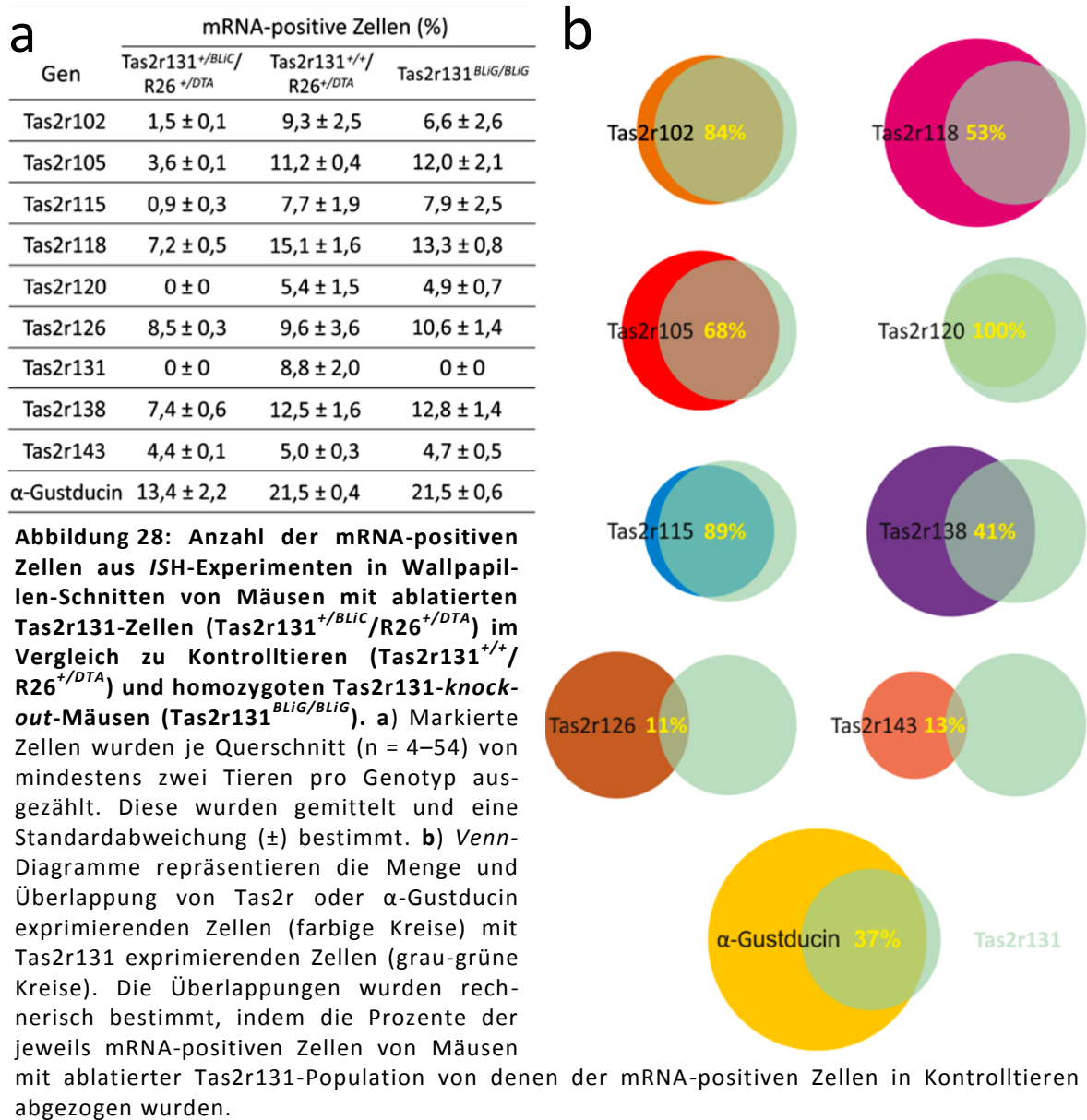


Abbildung 27: Ergebnisse von *ISH*-Experimenten in Wallpapillen-Schnitten von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) im Vergleich zu Kontrolltieren (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}) und homozygoten Tas2r131-*knock-out*-Mäusen (Tas2r131^{BLiG/BLiG}).

Exemplarische Bilder von *In-situ*-Hybridisierungen mit *antisense*-Sonden in VP-Gewebeschnitten (10 µm) zeigen unterschiedlich viele markierte Zellen für die verschiedenen Bitterrezeptor- und α-Gustducin-mRNAs in Kontrolltieren (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}, mittlere Reihe) und in Tas2r131-*knock-outs* (Tas2r131^{BLiG/BLiG}, rechte Reihe). Diese beiden Gruppen geben ein gleiches Bild für den mRNA-Nachweis der verschiedenen Tas2r, allein Tas2r131-mRNA ist nicht in den *Knock-out*-Tieren, aber in Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}-Tieren nachweisbar. Tas2r131- sowie Tas2r120-mRNA-positive Zellen sind in Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}, vordere Reihe) nicht aufzufinden. Von Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r126, Tas2r138, Tas2r143 und α-Gustducin sind mRNA-Sequenzen unterschiedlich stark bzw. oft in Tieren mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation nachweisbar.

Maßstab: 50 µm. (Daten teils auch in Freydank 2012).

3 Ergebnisse



In VP-Schnitten der Kontrollmäuse (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}) wurden, aufsteigend sortiert, unterschiedlich viele mRNA exprimierende Zellen gezählt: Tas2r143-mRNA ist in 5,0% ± 0,3% der Geschmacksknospenzellen detektierbar; Tas2r120-mRNA in 5,4% ± 1,5%; Tas2r115-mRNA in 7,7% ± 1,9%; Tas2r131-mRNA in 8,8% ± 2,0%; Tas2r102-mRNA in 9,3% ± 2,5%; Tas2r126-mRNA in 9,6% ± 3,6%; Tas2r105-mRNA in 11,2% ± 0,4%; Tas2r138-mRNA in 12,5% ± 1,6%; Tas2r118-mRNA in 15,1% ± 1,6% und α-Gustducin-mRNA in 21,5% ± 0,4% der Zellen (Abbildung 28a). Vergleichbar viele mRNA-positive Zellen sind in Geschmacksknospenquerschnitten der Tas2r131-*knock-out*-Mäuse (Tas2r131^{BLiG/BLiG}) vorhanden (Abbildung 28a, letzte Spalte). Nur Tas2r131-mRNA selbst ist, wie bereits angeführt, in diesem Genotyp nicht nachweisbar. In VP der Mäuse mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) wurden für die untersuchten mRNA-Sequenzen jeweils weniger positive Zellen als in den Kontrolltieren ausgezählt (Abbildung 28a, erste Spalte). Zieht man die mittlere Zahl dieser ausgezählten

Zellen von den durchschnittlichen Zellzahlen der Kontrollmäuse (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}) ab, kann man auf die Überlappungen der mRNA ko-exprimierenden Zellen schließen. Diese sind in Abbildung 28b mittels Mengen-Diagrammen dargestellt. Dabei gibt die Größe der Kreise die durchschnittliche Anzahl der mRNA-positiven Zellen, und die Überschneidung der Kreise die Prozentzahl der berechneten Überlappung der Zellpopulationen an. So überlappen Tas2r102-mRNA-positive Zellen zu 84% mit Tas2r131-Zellen, Tas2r105-mRNA exprimierende Zellen überlappen zu 68% mit Tas2r131-Zellen. Tas2r115-mRNA exprimierende Zellen überlappen zu 89% mit Tas2r131 exprimierenden Zellen. Tas2r118-mRNA exprimierende Zellen überlappen nur zu 53% mit den Tas2r131-Zellen. Tas2r120-mRNA-positive Zellen sind zu 100% mit Tas2r131-Zellen ko-exprimiert. Tas2r138-mRNA-positive Zellen überlappen zu 41% mit den Tas2r131-Zellen. Tas2r126-mRNA-positive Zellen zeigen eine Überlappung von nur 11% mit Tas2r131-Zellen, Tas2r143-mRNA-positive Zellen überlappen nur zu 13% mit Tas2r131-Zellen in der Wallpapille. (Abbildung 28b)

Zusätzlich bilden laut Kalkulation Tas2r131-Zellen eine Subpopulation von 37% der α -Gustducin-mRNA exprimierenden Zellen in der VP, wobei nach dieser Rechnung auch einige wenige Tas2r131 exprimierende Zellen existieren müssten, die keine α -Gustducin-mRNA enthalten (Abbildung 28b).

Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen der in den *ISH*-Experimenten genutzten RNA-Sonden, wurden neben den *antisense*-Sonden sogenannte *sense*-Sonden, die der nachzuweisenden mRNA-Sequenz entsprechen und somit nicht binden sollten, verwendet (siehe Seite 52). In beispielhaften Bildern dieser Kontroll-Hybridisierungen wird ersichtlich, dass in allen Genotypen keine mRNA-Sequenzen der verschiedenen Bitterrezeptoren sowie α -Gustducin nachweisbar sind (Abbildung 29).

Die Spezifität der genutzten *antisense*-Sonden wurde überdies in *Dot-Blot*-Hybridisierungen überprüft (Protokoll siehe Seite 53). Selbst nächstähnliche Tas2r-Sequenzen sind in den *Dot-Blot*-Experimenten mit spezifischen Tas2r-RNA-Sonden nicht oder nur sehr schwach detektierbar (siehe Anhang Abbildung 37, Seite 162). Somit ist der Nachweis einer anderen, als der jeweils gesuchten Tas2r-mRNA, unwahrscheinlich.

Zusammenfassend zeigen auch die *ISH*-Analysen in VP von Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}-Mäusen deutlich, dass eine heterogene Bitterrezeptor exprimierende Zellpopulation existiert. Es konnte abermals bestätigt werden, dass es unterschiedliche mRNA-Expressionshäufigkeiten der verschiedenen Bitterrezeptoren gibt, bei der manche Bitterrezeptor-mRNAs in weniger, manche aber in einem größeren Anteil von Zellen zu finden sind. Die Expressionshäufigkeiten in den Wallpapillen-Zellen zeigen überdies vergleichbare Tendenzen zu den Expressionsleveln in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem Epithel. Es konnte gezeigt werden, dass Bitterrezeptor-mRNA exprimierende Zellen existieren, welche nicht Tas2r131 ko-exprimieren. Außerdem überlappen Tas2r131-Zellen scheinbar zu unterschiedlichen Anteilen mit Zellen, die mRNAs anderer Bitterrezeptoren exprimieren. Die Resultate der *ISH*-Analysen in Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}-Mäusen ähneln den aufgefundenen Expressionshäufigkeiten und Überlappungen der Tas2r-(mRNA) exprimierenden Zellen in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen (Abbildung 21).

3 Ergebnisse

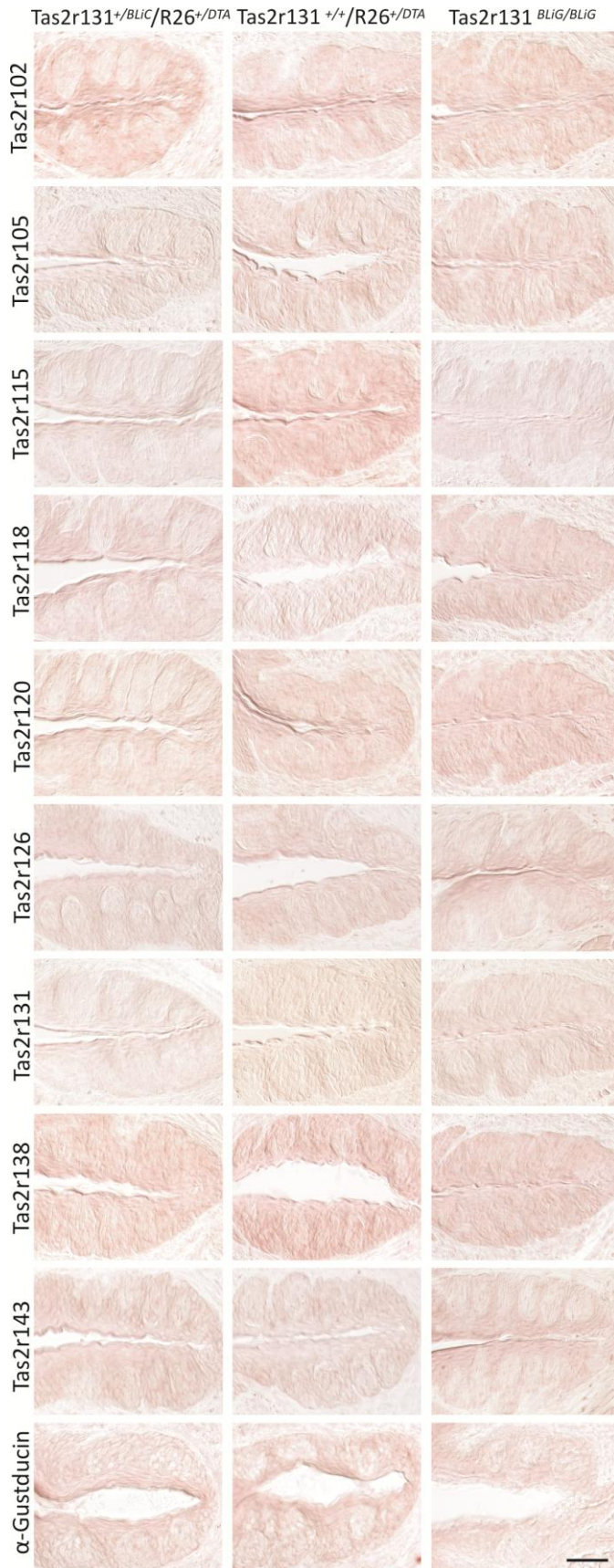


Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der Kontrollen zu Abbildung 27. In ISH-Experimenten mit *sense*-Sonden prozessierte Wallpapillen-Schnitte von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}), Kontrolltieren (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}) und homozygoten Tas2r131-knock-out-Mäusen (Tas2r131^{BLiG/BLiG}).

Exemplarische Aufnahmen von *In-situ*-Hybridisierungen mit *sense*-Sonden in VP-Gewebeschnitten (10 µm) zeigen keine markierten Zellen für die verschiedenen Bitterrezeptor- und α-Gustducin-mRNA-Sequenzen, sowohl in Versuchstieren (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}, erste Reihe), als auch in den Tieren der Kontrollgruppen (Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}, mittlere Reihe und Tas2r131^{BLiG/BLiG}, rechte Reihe).

Maßstab: 50 µM (teilweise ähnliche Darstellung in Freydank 2012)

3.2.3 Funktionelle Analyse isolierter Bittergeschmacksrezeptorzellen der Maus mittels Einzelzell-*Calcium-Imaging*

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es eine heterogene Bitterzellpopulation innerhalb von Geschmackspapillen der Maus gibt. Diese zeichnet sich durch die geordnete Ko-Expression von bestimmten Bitterrezeptoren innerhalb dieser Zellen aus.

Zuletzt stellt sich nun die Frage, ob unterschiedliche Bitterrezeptor exprimierende Zellen auch funktionell verschieden sind. Dazu sollten einzelne Bitterzellen aus der Wallpapille der Maus mit unterschiedlichen Bitterstoffen stimuliert werden. Ob eine Zelle auf einen Bitterstoff reagiert, wurde mittels *Calcium-Imaging* (2.2.5.1, Seite 61) getestet. Denn infolge einer Aktivierung eines (Bitter)geschmacksrezeptors würde eine Signalkaskade ausgelöst, die zum Anstieg von Calciumionen (Ca^{2+}) im Zytoplasma führt. Für diese Experimente war es wichtig, dass verschiedene Bitterzellen auch unterscheidbar sind. Deshalb wurden dafür $\text{Tas2r131}^{BLiG/BLiG}$ -Mäuse genutzt. Durch die hrGFP-Fluoreszenz der ursprünglich Tas2r131 exprimierenden Zellen konnte somit ein „Typ“ von Bittergeschmacksrezeptorzellen identifiziert werden. Wie die bereits durchgeführten Experimente zeigen, müssten diese Zellen auch andere Bittergeschmacksrezeptoren ko-exprimieren. Darüber hinaus müsste es zusätzliche Bitterrezeptor exprimierende Zellen geben. Somit wurde erwartet, dass sowohl die hrGFP-positiven Zellen, als auch andere, d. h. hrGFP-negative Zellen, auf Bittersubstanzen reagieren.

In Abbildung 30 sind Ergebnisse von Versuchen dargestellt, in denen Reaktionen von aus $\text{Tas2r131}^{BLiG/BLiG}$ -Wallpapillen isolierten Zellen auf Denatoniumbenzoat (Den), 6-n-Propylthiouracil (PROP) oder Papaverin (Pap) aufgezeichnet wurden. So zeigt Abbildung 30a exemplarisch repräsentative Spuren der relativen Fluoreszenzänderung ($\Delta F/F$) im Verlauf gegen die Zeit. Und in Abbildung 30b findet sich eine zusammenfassende Darstellung aller gemessenen Bittergeschmacksrezeptorzell-Antworten auf die drei gebotenen Bitterstimuli.

Dabei wurden wenige hrGFP-positive Zellen mit einer eindeutig messbaren Reaktion oder auch ohne eindeutig messbare Antwort gefunden. So gibt es zwei Zellen, die nicht auf Den reagierten; eine Zelle, welche nicht mit PROP stimulierbar war und drei von drei gemessenen hrGFP-positiven Zellen, die auf Pap reagierten (Abbildung 30b, repräsentative Spuren Abbildung 30a).

Mehrere hrGFP-negative Zellen reagierten auf die drei gegebenen Bitterstoffe. So existieren elf stimulierbare Zellen, von denen zehn eindeutig auf Den reagierten, jedoch eine nicht mit Den stimulierbar war. Von drei Zellen waren zwei nicht mit PROP erregbar, eine reagierte auf PROP. Weiterhin reagierten von sechs Zellen fünf auf Papaverin, eine nicht. (Abbildung 30b, repräsentative Spuren Abbildung 30a)

Insgesamt scheinen die Fluoreszenzantworten und damit die berechneten $\Delta F/F$ -Werte für hrGFP-positive Zellen in der Regel etwas kleiner auszufallen, als für hrGFP-negative Zellen (Bsp. Abbildung 30a, Anregung mit Pap: grüne Kurve – hrGFP-positive Zelle,

3 Ergebnisse

schwarze Kurve – hrGFP-negative Zelle). Die Ursache dafür könnte in der hrGFP-Eigenfluoreszenz liegen, die durch ihr teilweise überlappendes Emissionsspektrum mit dem *Fura*-Reporter die Fluoreszenzsignale etwas überlagern könnte.

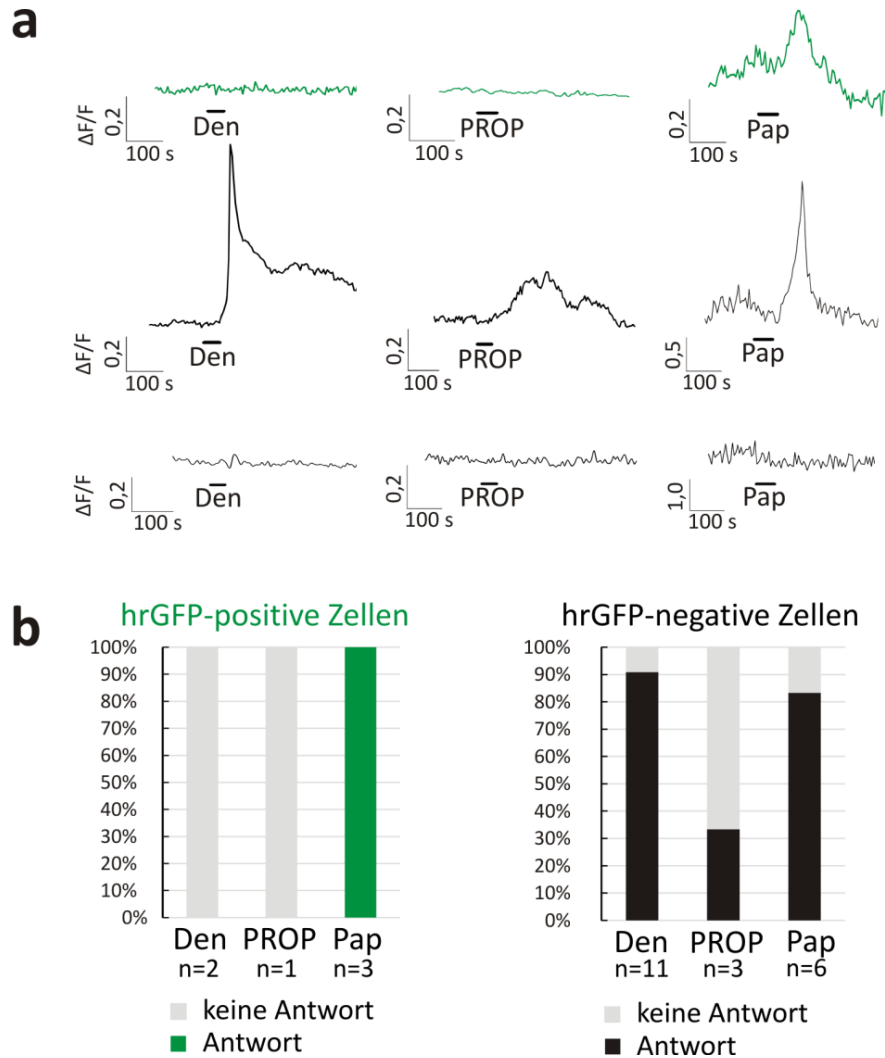


Abbildung 30: Zusammenstellung der Ergebnisse von Einzelzell-Calcium-Imaging-Experimenten isolierter Bittergeschmacksrezeptorzellen aus *Tas2r131^{BLIG/BLIG}*-Mäusen. **a)** Repräsentative *Calcium-Imaging*-Spuren von hrGFP-positiven Zellen (grün) und hrGFP-negativen Zellen (schwarz), die mit Denatoniumbenzoat (Den), 6-*n*-Propylthiouracil (PROP) oder Papaverin (Pap) stimuliert wurden. Dargestellt ist die relative Fluoreszenzänderung ($\Delta F/F$) im Verlauf gegen die Zeit. Schwarze Querbalken stellen Zeitpunkt und Dauer der Stimulation mit der entsprechenden (darunter gekennzeichneten) Bittersubstanz-Lösung dar. **b)** Darstellung der Summe aller eindeutigen Reaktionen von sowohl hrGFP-positiven (links), als auch hrGFP-negativen (rechts) Geschmackszellen auf drei verschiedene Bittersubstanzen (Den, PROP und Pap). Zwei (100%) der hrGFP-positiven Zellen reagieren nicht auf Den, eine nicht auf PROP, jedoch drei (100%) sind durch Pap stimulierbar. Von den hrGFP-negativen Zellen reagieren 90% (zehn aus elf) auf Den, ~33% (eine von drei) auf PROP und ~83% (fünf von sechs) auf Pap.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der Bittergeschmackswahrnehmung der Maus auf verschiedenen Ebenen untersucht.

Zuerst wurden Analysen zu Expressionsorten von Bittergeschmacksrezeptoren durchgeführt. Speziell wurden dafür, im Rahmen einer Charakterisierung der in der Abteilung Molekulare Genetik des *DIfE* durch Dr. Anja Voigt neu generierten, genetisch modifizierten Mauslinien (siehe 2.1.10, Seite 32), die Expressionsorte des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r131 in der Maus beleuchtet und sowohl im gustatorischen, als auch im extragustatorischen Bereich anhand des Fluoreszenzreporters hrGFP (Tas2r131^{BLiG/BLiG-} und Tas2r131^{BLiG/BLiG/} Tas1r1^{BLiR/BLiR-}Mauslinien) visualisiert.

Danach wurde in C57BL/6-Mäusen zunächst untersucht, ob alle bisher als funktionell beschriebenen Bitterrezeptoren überhaupt in Geschmacksgewebe exprimiert werden. Anschließende Untersuchungen zielten auf die Fragestellung ab, ob es eine heterogene Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation in Mäusen gibt, die wohlmöglich in der Lage ist verschiedene Bitterstoffe zu unterscheiden. Um dies zu beantworten, wurden zahlreiche Expressionsanalysen durchgeführt, welche dazu dienten, zum ersten Mal die Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation von Mäusen bezüglich ihrer Ko-Expression der Tas2r in einzelnen Zellen detailliert zu beschreiben. Dazu erfolgte eine Analyse der Tas2r131 exprimierenden Zellpopulation in Wall- und Blätterpapillen von Tas2r131^{BLiG-}Mäusen, sowie einige Untersuchungen der Ko-Expression dieses Rezeptors mit α -Gustducin und anderen Tas2r. Außerdem wurde die Ko-Expression aller Maus-Bitterrezeptoren mit Tas2r131 in Mäusen mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation (Tas2r131^{+/BLiC/R26^{+/DTA}}) analysiert. Darüber hinaus erfolgte eine funktionelle Analyse isolierter Bittergeschmacksrezeptorzellen von Tas2r131^{BLiG-}Mäusen für einige bis dahin bekannte Bitterstoffe.

In der Diskussion sollen nun zunächst die Implikationen der Tas2r-Expressionsorte im gustatorischen, sowie im extragustatorischen Bereich im Hinblick auf die funktionelle Rolle von Bittergeschmacksrezeptoren kurz erläutert werden. Danach erfolgt eine ausführliche Diskussion der Befunde zur Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation und der Ko-Expression der Tas2r. Ob die Möglichkeit besteht, Bitterstoffe geschmacklich zu unterscheiden, wird nachfolgend erörtert. Dafür werden das Tas2r-Expressionsmuster und die funktionellen Einzelzell-Analysen im Zusammenhang mit kürzlich identifizierten Liganden der Bitterrezeptoren (Loßow 2011), sowie mit gesondert für diese Fragestellung durchgeführten Bittergeschmacks-Verhaltensanalysen (Sabine Frenzel, Antje Stolzenburg) diskutiert.

4.1 Expressionsorte von Maus-Bitterrezeptoren

In der Literatur gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass Bittergeschmacksrezeptoren nicht nur in extragustatorischen Organen exprimiert werden, sondern dort auch wichtige Funktionen erfüllen könnten (siehe Einleitung 1.3.5.1, Seite 16). Diese Gegebenheit beeinflusst die Aufklärung der immer noch nicht vollständig entschlüsselten Funktionsweisen der Tas2r. Denn sie wirft wiederum die Frage auf, ob tatsächlich alle bisher als funktionell identifizierten Maus-Tas2r gustatorische Funktionen erfüllen. Außerdem könnte der experimentelle Einsatz von Tas2r-*Knock-outs* sich nicht nur auf deren Geschmackssystem auswirken, sondern auch nicht vorhersehbare (eventuell ungewünschte) Effekte hervorrufen. Um diesen Fragen auf den Grund zu gehen, wurden in der vorliegenden Arbeit im Gewebe-*Screening* mittels Endpunkt-RT-PCR mRNA-Expressionsorte von Tas2r131 im Vergleich zu Tas2r108 in C57BL/6-Mäusen untersucht (Abbildung 9, Seite 67). Die Befunde daraus bildeten die Grundlage für eine umfassende Charakterisierung der Mauslinie Tas2r131^{BLiG}, vor allem hinsichtlich ihres Fluoreszenzreporters, hrGFP. Denn alle Organe, in welchen Tas2r131-mRNA nachgewiesen werden konnte, wurden in weitergehenden Studien, teils ebenso innerhalb dieser Arbeit, genauer auf gewebe-intrinsische Tas2r131-Reporter-Fluoreszenzen untersucht (Bagus 2011; Voigt 2011; Döring 2012; Voigt, Hübner *et al.* 2012). Außerdem wurden innerhalb der C57BL/6-Mauslinie alle 35 Bittergeschmacksrezeptoren hinsichtlich ihrer gustatorischen Expression analysiert (4.1.4., Seite 122).

4.1.1 Expressionsorte von Tas2r131

Die durchgeführten Analysen lassen vermuten, dass Tas2r131 sowohl gustatorische, als auch extragustatorische Funktionen aufweist. Denn Tas2r131-mRNA kann insgesamt in Pilz-, Blätter- oder Wallpapillen-haltigem Zungengewebe, im Gaumen, NID und Vomeronasalorgan, im Geschmacksknospen-enhaltenden Kehldeckel, im Thymus, in Testes und im Nebenhodenkopf, in verschiedenen Gehirnnarealen (Cortex, Hypothalamus und Riechkolben) und im *Ganglion geniculatum* nachgewiesen werden (Abbildung 9, Seite 67). Dabei zeigt Tas2r131 (hrGFP) allerdings lediglich vereinzelte, lokal begrenzte Expression im nichtgustatorischen Bereich, was dessen Analyse als Repräsentant der Tas2r im gustatorischen System, sowie in einzelnen extragustatorischen Geweben befürwortet.

4.1.1.1 Tas2r131 in gustatorischen Geweben

Alle Geschmacksknospen aufweisenden Organe (Zunge, Gaumen, NID, Kehldeckel), die zum gustatorischen System gezählt werden, weisen auch Tas2r131-mRNA auf (Abbildung 9, Seite 67), was eine Funktion von Tas2r131 als funktioneller Geschmacksrezeptor bekräftigt. Weitere Untersuchungen dieser Gewebe hinsichtlich der zellulären Expression des hrGFP-Reporterproteins wurden innerhalb verschiedener Arbeiten durchgeführt. Darin konnte unter anderem gezeigt werden, dass hrGFP zuverlässig in einer Subpopulation von Typ II-Zellen exprimiert wird (Voigt 2011; Voigt, Hübner *et al.* 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von hrGFP (Tas2r131) im Zungen-, sowie im Gaumenepithel vergleichend zum Tas1r1-Fluoreszenzreporter, mCherry, visualisiert (ab Seite 70). Innerhalb der Zungenpapillen kommen Tas2r131-hrGFP-Zellen deutlich häufiger in Wall- und Blätterpapillen (VP und FoP), als in Pilzpapillen (FuP) vor (Abbildung 11, Abbildung 12). Dagegen sind nur vereinzelt Tas1r1-mCherry-Zellen in VP und FoP zu finden, die wiederum gehäuft in FuP auftreten (Ausschnittvergrößerung e – Abbildung 11). Die Befunde gehen mit bisherigen Erkenntnissen zur murinen Bittergeschmacksrezeptor-Expression der Literatur einher, welche zeigen dass Tas2r-mRNA deutlich seltener in FuP, als in VP oder FoP vorkommt (Adler, Hoon *et al.* 2000). Darüber hinaus werden sie durch eigene Auszählungen bekräftigt, die zeigen, dass rund 84% der VP- bzw. FoP-Geschmacksknospen hrGFP (Tas2r131) aufweisen, jedoch nur ca. 21% der Geschmacksknospen der Pilzpapillen (Voigt, Hübner *et al.* 2012).

Innerhalb des weichen Gaumens sind sehr viele hrGFP(Tas2r131)-positive Zellen, sowohl im Geschmacksstreifen, als auch in den dahinter gelegenen Geschmacksknospen zu finden (Abbildung 13, Seite 71). Meist ist in denselben Geschmacksknospen auch der Tas1r1-Reporter mCherry lokalisiert. So gestaltet sich im weichen Gaumen eine eher gleichmäßige topographische Verteilung von wahrscheinlich sowohl bitter-, als auch umami-reagierenden Geschmacksknospen. Dabei ist anzumerken, dass aber einzelne Zellen in den doppelt genetisch manipulierten Mäusen (Tas2r131^{BLiG/BLiG}/Tas1r1^{BLiR/BLiR}) niemals beide Reporter-Fluoreszenzen (hrGFP und mCherry) gleichzeitig enthielten (siehe auch Voigt, Hübner *et al.* 2012). Das wiederum untermauert das bereits in der Einleitung (1.3.5) beschriebene grundlegende Organisationsprinzip von separierten Geschmacksrezeptorzellen unterschiedlicher Geschmacksqualitäten (Zhang, Hoon *et al.* 2003; Zhao, Zhang *et al.* 2003; Mueller, Hoon *et al.* 2005; Huang, Chen *et al.* 2006; Tomchik, Berg *et al.* 2007; Chandrashekar, Kuhn *et al.* 2010).

4.1.1.2 Tas2r131 in extragustatorischen Geweben

Wie bereits in der Einleitung geschildert (1.3.5.1, Seite 16), existieren in respiratorischen Geweben die sogenannten *solitary chemosensory cells* (SCCs), welche nicht nur geschmacksspezifische Signalkomponenten, sondern auch Tas2r108- und Tas2r119-, jedoch keine Tas2r105-mRNA exprimieren (Finger, Bottger *et al.* 2003). Deren Stimulation mit Bitterstoffen (Finger, Bottger *et al.* 2003), wie z. B. auch dem Agonisten für Tas2r108, Denatonium (Gulbransen, Clapp *et al.* 2008), erzeugt eine Absenkung der Respirationsrate, was als Schutzmechanismus vor der Inhalation gefährlicher Substanzen interpretiert wird (Finger, Bottger *et al.* 2003). Auch Acyl-Homoserinlactone, die zum Teil von Bakterien als *Quorum-sensing*-Moleküle genutzt werden, stimulieren Maus-SCCs und können, vermittelt durch Bittergeschmacks-Signalkomponenten, zu Veränderungen der Respirationsrate führen (Tizzano, Gulbransen *et al.* 2010). In der vorliegenden Arbeit kann die Expression eines weiteren Bittergeschmacksrezeptors, Tas2r131, im Nasenepithel demonstriert werden (Abbildung 10, Seite 69). Außerdem wurde bei der späteren Analyse von sehr jungen Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/ τ GFP}-Mäusen festgestellt, dass im Respiratorischen Epithel der Tas2r131-Reporter τ GFP zum Teil mit α -Gustducin in denselben Zellen ko-lokalisiert ist (Döring 2012). Somit lässt sich ver-

muten, dass es sich bei den Tas2r131 exprimierenden Zellen des Nasenepithels um SCCs handeln könnte. Dies würde nach Auffinden eines Tas2r131-Liganden einen großen Vorteil/Fortschritt für zukünftige Untersuchungen der Bittergeschmacksrezeptor-Funktion in SCCs darstellen. Denn so könnten nicht nur die Tas2r131-Zellen visualisiert und funktionell charakterisiert, sondern auch deren Funktionalität mittels des Tas2r131-*Knock-outs* bestätigt werden. Dies würde zur Aufklärung beitragen, ob Tas2r wirklich direkt in die bisher beschriebenen Mechanismen der Veränderungen der Respirationsrate nach Stimulation von SCCs involviert sind.

Das VNO, als bekanntes olfaktorisches Organ vieler Wirbeltiere, ist in Säugern hauptsächlich ein Detektor von Pheromonen, welche zum Beispiel das Sexual- oder Sozialverhalten steuern. Diese werden von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (V1R, V2R und FPR) erkannt, welche in sogenannten bipolaren (sensorischen) Neuronen des Sensorischen Epithels des VNO lokalisiert sind. In dieser Art von Zellen konnte auch das geschmacksassoziierte Molekül α -Gustducin nachgewiesen werden (Zancanaro, Caretta *et al.* 1999), welches bislang – neben α -Transducin (Ruiz-Avila, McLaughlin *et al.* 1995) – als die in die Bittergeschmacks-Signalübertragung involvierte G-Protein- α -Untereinheit identifiziert wurde (Wong, Gannon *et al.* 1996). Da anhand der Morphologie des Gewebes die in dieser Arbeit erstmals visualisierten hrGFP(Tas2r131)-positiven Zellen (Abbildung 10) auch dem sensorischen Epithel des VNO zuzuordnen sind, könnten diese Zellen auch ko-lokalisiert mit α -Gustducin und damit von ihrer Identität bipolare Neurone sein. Tatsächlich stellte Linda Döring während ihrer Masterarbeit bei Untersuchungen von sehr jungen Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/ τ GFP}-Mäusen fest, dass im VNO τ GFP-positive (Tas2r131) Zellen lediglich zum Teil mit α -Gustducin ko-exprimiert sind (Döring 2012). Indes wurden Zellen im VNO, welche anhand der Expression eines TRPM5-Reporters (und 95% Ko-Expression von α -Gustducin) identifiziert wurden, auch als SCCs beschrieben, welche von trigeminalen Nerven innerviert werden (Ogura, Krosnowski *et al.* 2010). Die Tas2r131 exprimierenden Zellen könnten also auch SCCs darstellen. Eine große Bandbreite von Substanzen ist in der Lage Zugang zum VNO zu erlangen, entweder als natürliche Bestandteile von Körper-Ausscheidungen, Umweltbestandteile, oder inhalierte volatile Stoffe, die sich in der nasalen Flüssigkeit lösen. SCCs des VNO wurden bereits auf deren Calcium-Reaktion auch gegenüber verschiedenen Bittersubstanzen (Denatoniumbenzoat, Natriumbenzoat, Cycloheximid, Naringin und hochkonzentriertes Saccharin) getestet (Ogura, Krosnowski *et al.* 2010). Mehr als die Hälfte der SCCs reagierte dabei auf diese Bitterstoffe, wobei individuelle SCCs unterschiedlich auf die Stoffe ansprachen. Außerdem konnte mit Hilfe eines speziellen Assays und Trpm5-*Knock-out*-Mäusen auf eine Rolle der SCCs in der Regulation des Eintritts chemischer Stoffe ins VNO geschlossen werden (Ogura, Krosnowski *et al.* 2010). Auch für die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im VNO kann somit eine Funktion als Detektoren von toxischen Stoffen für die Auslösung eines Schutzmechanismus vermutet werden. Obwohl in den funktionellen Studien die Rolle von PLC und Trpm5 in der Bitterstoff-Signalisierung gezeigt wurde (Ogura, Krosnowski *et al.* 2010), bleibt jedoch abermals die direkte Beteiligung der Tas2r in der Vermittlung der gezeigten Effekte zu bestätigen.

In Ratten konnte mittels RT-PCR bereits die mRNA-Expression verschiedener Bittergeschmacksrezeptoren (Tas2r105, Tas2r107, Tas2r113, Tas2r119, Tas2r121, Tas2r123, Tas2r126 und Tas2r134) in Larynx, Trachea, teilweise bis hin zur Lunge (Tas2r119 und Tas2r126) gezeigt werden (Tizzano, Cristofolletti *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen weder Tas2r131-mRNA-Expression in C57BL/6-, noch hrGFP-Fluoreszenz in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen in diesen Organen nachgewiesen werden. Später jedoch stellten weiterführende Analysen von Tas2r131^{BLiC/+}/R26^{τGFP/+}-Tieren τGFP-positive (Tas2r131) Zellen im respiratorischen Epithel von Trachea und Lunge fest (eigene Beobachtungen und Döring 2012). So lässt sich vermuten, dass Tas2r131 zwar in diesen Geweben vorkommt, doch nur zu geringen mRNA-Expressionsspiegeln oder in weniger Zellen als die dort nachgewiesenen Tas2r der Tizzano-Studie. Somit wäre erklärbar, dass zwar keine Tas2r131-mRNA im Gesamt-Trachea- bzw. Lungengewebe detektierbar und durch eventuell geringere Expression auch kein hrGFP-Reporter in Gewebeschnitten von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen nachweisbar ist. Eine τGFP-Expression jedoch, die durch die unter dem Tas2r131-Promoter aktive Cre-Rekombinase aktiviert wird und danach stetig über den ROSA26-Promoter erfolgt, kann visualisiert werden. Allgemein könnten für die vermuteten unterschiedlichen Expressionsstärken der verschiedenen Tas2r (Tas2r131 und Tas2r der Tizzano-Studie) im respiratorischen System überdies speziesspezifische Unterschiede zwischen Ratte und Maus zum Tragen kommen. Darüber hinaus ist nicht klar, ob die in der Tizzano-Studie nachgewiesenen Tas2r-mRNA-Sequenzen nicht ebenso in Muskelzellen, wie bereits für den Bittergeschmacksrezeptor Tas2r107 gezeigt (Zhang, Lifshitz *et al.* 2013), vorkommen könnten. So bleibt die Rolle der Bittergeschmacksrezeptoren in den unteren Abschnitten des respiratorischen Systems weiter aufzuschlüsseln. Wie bereits in der Einleitung (1.3.5.1, Seite 16) erwähnt, zeigen isolierte Maus-Luftröhren-Muskelzellen nach Stimulation mit Bitterstoffen bronchodilatatorische Effekte (Deshpande, Wang *et al.* 2010; Zhang, Lifshitz *et al.* 2013). Auch im humanen Organismus konnte vor kurzem die Expression von TAS2R-mRNA in Bronchien sowie deren Relaxation ausgelöst von Bitterstoffen, die bereits als TAS2R-Agonisten identifiziert wurden, demonstriert werden (Grassin-Delyle, Abrial *et al.* 2013). Doch bleibt abermals die Abhängigkeit der gezeigten Effekte von den Bitterrezeptoren noch zu bestätigen.

Weitere Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen sowohl Tas2r131-mRNA in C57BL/6-Thymus (Abbildung 9), als auch hrGFP-positive Zellen in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Gewebeschnitten (Abbildung 10) des Thymus. Der Thymus dient als primäres lymphatisches Organ der T-Lymphozyten-Entwicklung und lässt sich histologisch in Rinde und Mark unterscheiden. Im Mark befinden sich gereifte T-Lymphozyten, die von dort aus ins Blut entlassen werden, außerdem Makrophagen, dendritische Zellen und myoide Zellen. Die meisten in dieser Arbeit dargelegten hrGFP-positiven Zellen sind eher im Thymus-Mark zu beobachten. Dies wurde auch in Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/τGFP}-Tieren bestätigt, bei denen τGFP-positive Zellen ebenfalls hauptsächlich im Mark des Thymus zu finden sind (eigene Beobachtungen und Döring 2012). Laut ihrer meist abgerundeten Morphologie, könnte man spekulieren, dass es sich bei den Tas2r131 exprimierenden Zellen entweder um reife T-Lymphozyten, um Makrophagen oder um myoide Zellen handelt.

Weitere Forschungen sind notwendig, um aufzuklären welche Zelltypen des Thymus Tas2r131 und womöglich weitere Bittergeschmacksrezeptoren exprimieren und was deren Funktion dort sein könnte.

Bereits im Jahre 2000 wurde Tas2r-mRNA in Testes von Mäusen entdeckt (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000). Gegenwärtig konnte auch gezeigt werden, dass nicht nur mRNA-Sequenzen aller als funktionell beschriebenen Maus-Bitterrezeptoren in Testes zu finden sind, sondern diese auch unterschiedliche Expressionslevel aufweisen (Xu, Cao *et al.* 2013). Mittels *ISH* konnte überdies die mRNA von Tas2r105 und Tas2r108 in Hoden-Tubuli lokalisiert werden (Xu, Cao *et al.* 2013). In denselben Bereichen der Tubuli ist auch in der vorliegenden Arbeit (in Abbildung 10) die Tas2r131-Reporter-Fluoreszenz des hrGFP in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen darstellbar. Diese Bereiche beinhalten die post-meiotischen haploiden Spermien-Vorläuferzellen (Spermatozyten zweiter Ordnung und Spermatiden). Einhergehend beobachtete Linda Döring in sehr jungen (vor-pubertären) Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/*τ*GFP}-Mäusen überaus selten eine Fluoreszenz einiger prä-meiotischer Zellen in den unreifen Hoden-Tubuli (Döring 2012). In meinen Versuchen zeigten sich im Hoden überdies unterschiedlich starke Fluoreszenzsignale, deren Intensität mit höherer Entwicklung der Spermatozoen-Vorläufer-Zellen zunimmt (von außen nach innen, siehe Abbildung 10). So lässt sich vermuten, dass hrGFP- bzw. Tas2r131-Expression in den Spermatozyten beginnt und bis zur Entwicklungsphase der Spermatiden andauert. Im Nebenhoden taucht die hrGFP-Fluoreszenz dann nur noch im Lumen der Samenkanälchen auf (Abbildung 10). In isolierten Spermatozoen wird ferner deutlich, dass hrGFP hauptsächlich im Mittelstück des Schwanzes akkumuliert (Abbildung 10). Ob in einer Wildtyp-Maus der Bittergeschmacksrezeptor Tas2r131 selbst auch dort lokalisiert ist, lässt sich nicht genau beantworten. Denn es könnte sein, dass ein für das Spermium nicht funktionelles Protein, wie das hrGFP, sich irgendwo anders, z. B. wie hier im Mittelstück des Schwanzes anlagert. Jedoch ein funktioneller Rezeptor könnte sowohl im Kopf, als auch im Schwanz eines Spermiums an die Membran transportiert werden und dort eine Aufgabe erfüllen. In funktionellen Studien einer Arbeitsgruppe (Xu, Cao *et al.* 2013) konnte mittlerweile gezeigt werden, dass sowohl aus Maushoden isolierte Spermatiden, als auch epididymale Spermien konzentrationsabhängig auf verschiedene Bitterstoffe mit einem intrazellulären Calcium-Anstieg reagieren. Dabei sind die stärksten Signale meist im Kopf- bis Mittelstück-Bereich des Spermiums zu messen, was, wenn diese Reaktion tatsächlich über Bittergeschmacksrezeptoren vermittelt würde, auf eine Expression der Tas2r in diesen Bereichen schließen ließe. Die Calcium-Reaktionen auf Bitterstoffe scheinen außerdem über die geschmacksspezifische Signalkomponente α -Gustducin vermittelt zu werden: Nicht nur konnte α -Gustducin bereits eindeutig in Spermatiden und Spermatozoen von Säugern nachgewiesen werden (Fehr, Meyer *et al.* 2007); darüber hinaus reagieren Spermien, die aus α -Gustducin-*knock-out*-Mäusen (*Gnat3*^{-/-}) isoliert wurden, nicht mehr auf gegebene Bitterstoffe (Xu, Cao *et al.* 2013). Individuelle Spermatiden oder Spermatozoen zeigen ferner unterschiedliche Reaktions-Profile auf verschiedene Bitterstoffe (Xu, Cao *et al.* 2013). Dafür könnten, wie von den Autoren spekuliert wurde, heterogene Expressionsmuster der Bitterrezeptoren in diesen Zellen ursächlich sein. Dies würde

auch erklären, warum Mäuse, in denen alle *Tas2r105* exprimierenden Zellen ablatiert werden, steril sind und diese Ablation zu kleineren Testes und zum Verlust eines Großteils der Spermatozoen führt (Li und Zhou 2012); jedoch die in meinen späteren Experimenten verwendeten *Tas2r131*-Zell-ablatierten Mäuse (*Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}*) oder auch *Tas2r131*-*Knock-out*-Mäuse (*Tas2r131^{BLiG/BLiG}*) derartige Merkmale von Sterilität offensichtlich nicht zeigen (eigene Beobachtungen). So könnte nämlich *Tas2r105* in (fast) allen Spermatozoen exprimiert werden und damit zum Absterben dieser führen; *Tas2r131* aber könnte z. B. nur in der Hälfte der Spermatozoen exprimiert sein und damit würden die übrigen Spermatozoen überleben. Ein Hinweis darauf findet sich in Expressionsniveaus von *Tas2r*, die in Testes von Mäusen gemessen wurden (Xu, Cao *et al.* 2013). Dort weist *Tas2r131* nur etwa halb so viele mRNA-Kopien auf, wie *Tas2r105* (Xu, Cao *et al.* 2013). Die Theorie von heterogen *Tas2r* exprimierenden Spermien bleibt allerdings noch zu bestätigen. Zur weiteren Aufklärung der Rolle von Bitterrezeptoren, insbesondere des *Tas2r131*, in reproduktiven Organen, werden diese in Mäusen mit *Tas2r131*-Zellablation zurzeit von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ingrid Boekhoff untersucht. So wird sich zeigen, ob den *Tas2r* eventuell eine ähnliche Rolle in der Spermien-Entwicklung bzw. -Reifung zukommt, wie jüngst den Genen *Tas1r3* und *Gnat3* (kodiert für α -Gustducin) zugeschrieben wurde (Mosinger, Redding *et al.* 2013).

Zur Bittergeschmacksrezeptor-Expression im Nervensystem ist bisher noch sehr wenig bekannt. Anja Voigt beschäftigte sich während ihrer Doktorarbeit u. a. mit der Visualisierung von *Tas2r131*-Reportern in Nervenzellen in den von ihr generierten, genetisch modifizierten Mäusen (Voigt 2011). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte in *Tas2r131^{BLiG/BLiG}*-Tieren keine hrGFP-Fluoreszenz innerhalb des Nervengewebes festgestellt werden. Jedoch in *Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/tdRFP}*-Mäusen, in denen die Cre-vermittelte Expression des tdRFP über den ubiquitär aktiven ROSA26-Promoter zu einer spezifischen Markierung der *Tas2r131*-Zellen führt, existieren tdRFP-fluoreszierende Nervenzellen (Voigt 2011). Diese finden sich sowohl in den Ganglien (GG und *Ganglia nodosum/petrosum* (NPG)), als auch im Gehirn der Mäuse (verschiedenste Areale, siehe Voigt 2011). Die Diskrepanz zu den *Tas2r131^{BLiG/BLiG}*-Tieren könnte zwei Ursachen haben. Einerseits könnte die Expression von *Tas2r131* dort eher schwach sein, d. h. der *Tas2r131*-Promoter wenig aktiv. Dies könnte dann zu einer eher schwachen Expression von hrGFP führen und damit auch dazu, dass hrGFP in *Tas2r131^{BLiG/BLiG}*-Mäusen nicht visualisierbar wäre. Demgegenüber, da die Expression von tdRFP in den *Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/tdRFP}*-Mäusen vom ROSA-Promoter kontrolliert wird, könnte diese dort eventuell stärker sein. Andererseits wäre es auch möglich, dass der *Tas2r131*-Promoter nur in sehr frühen Lebensphasen der Nervenzellen aktiv ist, weil z. B. *Tas2r131* eine Funktion bei der Entstehung der Nervenzellen erfüllte. In den *Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/tdRFP}*-Mäusen wäre der ROSA-Promoter dagegen nach der Cre-Aktivierung in den entsprechenden Zellen lebenslang aktiv. Obwohl Linda Döring in ihrer Masterarbeit den τ GFP-Reporter in Zellen des Nervengewebes schon in drei Tage alten *Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/ τ GFP}*-Mäusen nachweisen konnte (Döring 2012), ist die zweite Annahme trotzdem eher unwahrscheinlich. Dagegen spricht nämlich der *Tas2r131*-mRNA-Nachweis in Geweben des peripheren und zentralen Nervensystems in adulten Mäusen (Abbildung 9). Außerdem

konnte Antje Stolzenburg, die innerhalb ihrer Doktorarbeit in der MOGE zurzeit die Expression und Funktion von Bittergeschmacksrezeptoren im Nervensystem untersucht, bereits einige weitere Tas2r-mRNA-Sequenzen in verschiedenen Hirnregionen adulter Mäuse nachweisen (interne Information). So lässt sich insgesamt eher eine schwache, jedoch andauernde, Expression von Bitterrezeptoren im Nervengewebe vermuten. Geht man von einer eher schwachen Tas2r131-Expression in Neuronen aus, ist auch erklärbar, warum z. B. dessen mRNA in RT-PCR-Experimenten (Abbildung 9) zwar in GG, aber nicht in NPG bzw. nur in einigen Hirnabschnitten (Cortex, Hypothalamus und Riechkolben) nachweisbar war. Dass auch in Ratten-Hirnen Tas2r-mRNA und Bitter-Signalkomponenten nachgewiesen wurden (Singh, Vrontakis *et al.* 2011; Dehkordi, Rose *et al.* 2012), lässt eine Rolle von Bitterrezeptoren in Nervengeweben von Säugetieren vermuten; wobei eine Validierung dieser Befunde im Hinblick sowohl auf die exprimierenden Zelltypen, als auch auf zum Nachweis der Signalkomponenten verwendete Antikörper (Dehkordi, Rose *et al.* 2012) teils offen bleibt und damit notwendig erscheint. Die Funktion von Bittergeschmacksrezeptoren im peripheren und zentralen Nervensystem von Mäusen wird weiterhin von Antje Stolzenburg und Dr. Anja Voigt untersucht.

Erwähnenswert ist außerdem, dass innerhalb der hier gezeigten Endpunkt-RT-PCR-Experimente in allen gastrointestinalen Geweben keine Tas2r131-mRNA nachweisbar war (Abbildung 9). Auch ist es nicht möglich in gastrointestinalen Gewebeschnitten von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen eine intrinsische hrGFP-Fluoreszenz wahrzunehmen (eigene Beobachtungen und Bromke 2013). In weiterführenden Studien jedoch, in welchen sowohl verschiedene Tas2r-Expressionslevel hochsensitiv quantitativ bestimmt wurden (eigene Experimente, siehe Anhang Abbildung 38), als auch mit Hilfe von Tas2r131-Reporter-Mäusen (Tas2r131^{BLiC}/R26^{tdRFP}), gelang es uns die Expression des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r131 im Gastrointestinaltrakt nachzuweisen (Prandi, Bromke *et al.* 2013). Dabei wird deutlich, dass nur sehr wenige Zellen Tas2r131 exprimieren. Dies erklärt die Abwesenheit eines deutlichen RT-PCR-Nachweises in Gewebeproben des Gastrointestinaltraktes, wie auch in der Dissertation von Marta Bromke genauer betrachtet wird (Bromke 2013). Der Tas2r131 exprimierende Zelltyp stellt im Dickdarm eine Subpopulation von Becherzellen dar (Prandi, Bromke *et al.* 2013). Das Auftreten von Bitterrezeptoren in diesen Zellen legt eine Rolle der Tas2r bei Abwehrmechanismen gegen möglicherweise gefährliche Stoffe im Gastrointestinalsystem nahe (Prandi, Bromke *et al.* 2013). Da Tas2r131 in den quantitativen mRNA-Expressionsanalysen als einer der geringer exprimierten Bitterrezeptoren erfasst wurde (siehe Anhang Abbildung 38), wären umfassendere Untersuchungen anderer Bittergeschmacksrezeptoren innerhalb des Gastrointestinaltraktes sicherlich hilfreich, um deren genaue Funktion dort aufzuklären.

4.1.2 Expressionsorte von Tas2r108

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann Tas2r108 als ein Rezeptor begriffen werden, der scheinbar ubiquitär exprimiert ist. Denn, im Gegensatz zu Tas2r131, ist die mRNA von Tas2r108 in allen untersuchten gustatorischen, sowie nicht-gustatorischen

Organen nachweisbar (Abbildung 9, Seite 67). Die erstaunliche Tatsache, dass ein eigentlich als Geschmacksrezeptor kodierendes identifiziertes Gen gewebeübergreifend ausgeprägt wird, könnte auf eine allgemeine (oder gar existentielle) Funktion dieses Rezeptors hindeuten. Doch wichtig ist zu bemerken, dass eines von den Tas2r108-mRNA exprimierenden Geweben Blut darstellt. So könnte das Auffinden einer all-übergreifenden mRNA-Expression von Tas2r108 auch mit dessen Expression in Blutzellen begründet werden, da alle untersuchten Gewebe nach ihrer Entnahme noch Blutrückstände enthielten (siehe Methoden 2.2.3.1, Seite 40). Insgesamt muss also mit der Interpretation dieser Ergebnisse achtsam umgegangen werden. Einige im Folgenden diskutierte experimentelle Beobachtungen sprechen dennoch für eine gewebe- bzw. zellspezifische Tas2r108-mRNA-Expression im nichtgustatorischen Bereich.

4.1.2.1 Tas2r108 in extragustatorischen Geweben

Zur Untersuchung, ob gewebeeigene Zellen oder Blutzellen Tas2r108-mRNA aufweisen, müssten die Gewebe für eine anschließende RT-PCR-Analyse möglichst blutfrei entnommen werden. Danach würde sich eine quantitative Bestimmung empfehlen, damit mRNA-Expressionslevel von Blut und anderen Geweben verglichen werden können. Einige vergleichbare Analysen erfolgten bereits innerhalb der hier vorliegenden Arbeit.

Im Rahmen von Kontrollexperimenten (3.1.3.1.3, Seite 76) wurde u. a. sowohl die mRNA-Expression von Tas2r108 in Blut, als auch in nichtgustatorischem Zungenepithel im Vergleich zum Wall- und Blätterpapillen enthaltendem Zungenepithel quantitativ bestimmt. Dabei kann hier für beide Arten von Zungenepithelien, begründet durch deren Präparation (siehe 2.2.3.1, Seite 40), von einer vornehmlich blutfreien Entnahme ausgegangen werden. Da Tas2r108-mRNA ~8,7-fach stärker in nichtgustatorischem Epithel, als in Blut zu finden ist (Abbildung 16 und Tabelle 36, ab Seite 76), kann geschlossen werden, dass Tas2r108-mRNA auch in Zellen des Zungenepithels zu finden sind, die keine Papillen- oder Blutzellen darstellen.

Außerdem wurde, innerhalb der arbeitsgruppenübergreifenden Untersuchungen zur Expression von Bitterrezeptoren im Magen-Darm-Trakt (Prandi, Bromke *et al.* 2013), Tas2r108-mRNA von mir quantitativ bestimmt (siehe Anhang, Abbildung 38). Auch bei diesen Experimenten kann, durch anschließendes Spülen der entnommenen und entleerten Magen-Darm-Abschnitte, von einer blutarmen Präparation ausgegangen werden. Die in den Magen-Darm-Abschnitten gemessenen $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werte liegen zwischen ~0,0001 (distales Jejunum) und ~0,0005 (Magen). Diese relativen Expressionswerte sind damit mindestens mehr als dreifach bis zu mehr als zehnfach höher, als in Vollblut (~0,00003, Tabelle 36, Seite 76).

Nicht völlig auszuschließen ist jedoch, dass die Tas2r108-Expression in diesen extragustatorischen Geweben (wie Zungenepithel und Magen-Darm-Gewebe) von weißen Blutzellen (Leukozyten) herrührt. Denn diese sind in der Lage, in Gewebe einzuwandern. So könnte Tas2r108 also auch in Leukozyten innerhalb der nichtgustatorischen Gewebe exprimiert sein. Über die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren in weißen Blutzellen wird später noch ausführlicher debattiert (siehe 4.1.3.1, Seite 119).

Zusammenfassend könnte Tas2r108 entweder eine allgemeine, oder verschiedene Funktionen in diversen Organen, eventuell sogar in unterschiedlichen Zelltypen erfüllen. Es bleibt zu prüfen, ob tatsächlich das Tas2r108-Protein in all den Geweben zu finden ist und welche Zelltypen diesen Rezeptor exprimieren. Dass laut jetzigem Wissensstand noch kein funktionierender Tas2r108-Antikörper existiert, erschwert derartige Überprüfungen. Denn mit einem solchen wäre diese Art von Analysen leicht durchführbar. Eine weitere Möglichkeit bestünde in der Nutzung einer genetisch modifizierten Tas2r108-Mauslinie, die bisher jedoch leider nicht existiert.

In den *solitary chemosensory cells* (SCCs) der Nasenhöhle von Nagern konnten Finger und Kollegen bereits Tas2r108-mRNA mittels *ISH* nachweisen (Finger, Bottger *et al.* 2003). Außerdem scheinen nasale SCCs (Trpm5 exprimierende Zellen) auf verschiedene Bittersubstanzen (Denatonium, Phenylthiocarbamid [PTC], Cycloheximid, Salicin, 6-*n*-Propylthiouracil [PROP], u. a.) zu reagieren und vermutlich protektive (Atmungs-)Reflexe auszulösen (Finger, Bottger *et al.* 2003; Gulbransen, Clapp *et al.* 2008; Tizzano, Gulbransen *et al.* 2010). Als Tas2r108 aktivierende Liganden sind bis jetzt Denatonium, PROP, Amarogentin, Chininsulfat, Chlorpheniramin, Emetin, Noscadin und Yohimbin bekannt (Chandrashekar, Mueller *et al.* 2000; Loßow 2011). Noscadin scheint dazu keinen anderen Maus-Bittergeschmacksrezeptor zu aktivieren (Loßow 2011). So wäre es für Denatonium und PROP denkbar, dass diese in SCCs von Tas2r108 erkannt wurden und damit Tas2r108-vermittelt die oben beschriebenen Reflexe auslösten. Ein direkter Nachweis dafür wäre allerdings notwendig. Da Noscadin innerhalb der Tas2r bisher nur als Tas2r108-Aktivator identifiziert wurde, wäre eine Kombination der beschriebenen Experimente (Finger, Bottger *et al.* 2003; Gulbransen, Clapp *et al.* 2008) interessant, indem sowohl die Anzahl der auf diesen Stoff reagierenden SCCs, als auch die Anzahl der Tas2r108 exprimierenden Zellen bestimmt und verglichen würden.

4.1.2.2 Tas2r108 in gustatorischen Geweben

Die Befunde der vorliegenden Arbeit sprechen insgesamt dafür, dass Tas2r108 ebenso im gustatorischen Bereich funktionell exprimiert wird. Denn das Expressionslevel von Tas2r108-mRNA in Wall- und Blätterpapillen (VP und FoP) enthaltendem Zungenepithel ist mehr als zehnfach höher als in Geschmackspapillen-freiem Zungenepithel, bzw. mehr als 100-fach höher als in Blut (Tabelle 36 und Abbildung 17, ab Seite 77). Weil somit auf Tas2r108-Expression in Geschmackspapillen geschlossen werden kann, wird dessen Rolle als funktioneller Bittergeschmacksrezeptor in der Zunge bestärkt. In *ISH*-Experimenten konnte bisher jedoch Tas2r108-mRNA nicht in VP-Geschmacksknospenzellen nachgewiesen werden (Freydank 2012). Ob ein zu schwaches Expressionsniveau, experimentelle Limitationen, oder doch ein Fehlen der Tas2r108-mRNA in diesen Zellen dafür verantwortlich ist, bleibt zu überprüfen.

Generell würde sich Tas2r108 mit seinem hier beschriebenen Expressionsprofil, im Gegensatz zu Tas2r131, kaum als Repräsentant der Tas2r für eine Analyse im gustatorischen System eignen.

4.1.3 Tas2r-Expression in Blut & nichtgustatorischem Zungenepithel

Die breit gefächerten Expressionsorte von Tas2r108 werfen die Frage auf, ob dieser Bittergeschmacksrezeptor ein Einzelfall ist, oder ob es weitere Tas2r gibt, die sich ähnlich verhalten.

So könnte beispielsweise eine mögliche mRNA-Expression in Blut oder in Geschmackspapillen-freiem Zungenepithel Tas2r-Analysen im Papillen enthaltendem Zungenepithel generell beeinflussen. Deshalb wurde in Kontrollexperimenten (3.1.3.1.3, Seite 76) sowohl die mRNA-Expression in Blut, als auch in Geschmackspapillen-freiem Zungenepithel im Vergleich zum VP+FoP-Epithel für alle 35 Maus-Tas2r quantitativ bestimmt.

4.1.3.1 Blut

Für folgende Bitterrezeptoren konnte mRNA-Expression in Blut nachgewiesen werden: Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143. Darüber hinaus sind auch mRNA-Sequenzen der Umamirezeptor-Untereinheiten Tas1r1 und Tas1r3, sowie von NTPDase2 und α -Gustducin in Vollblut von Mäusen exprimiert. Dieselben Maus-Tas2r, deren mRNA in den Experimenten dieser Arbeit in Blut zu finden sind, wurden ferner bereits publiziert (siehe auch Einleitung 1.3.5.1, Seite 16), in murinen Herzmuskelzellen und Fibroblasten exprimiert zu sein (Foster, Porrello *et al.* 2013). Mittels quantitativer RT-PCR wiesen die Autoren die Expression von insgesamt sieben Tas2-Rezeptoren in Herzgewebe von neugeborenen Ratten nach (zusätzlich zu den oben genannten, auch von Tas2r120 und Tas2r121). Die Expression aller Ratten-Tas2r scheint dabei vor allem in Herzmuskelzellen, aber auch in Fibroblasten aufzutreten, wie Experimente mit isolierten und kultivierten Zellen dieser Typen zeigten. Bei Glucose-Mangel ist die Tas2r-Expression in kultivierten murinen Herzmuskelzellen erhöht. Auch in Herzgewebe von Mäusen, die man zuvor 48 Stunden hungern ließ, sind die Tas2r-Expressionslevel höher als in gefütterten Mäusen. Dies ließ die Autoren der Studie auf eine potentielle Funktion der Bitterrezeptoren als Sensoren für mit der Nahrung aufgenommene Stoffe im Herzen schließen (Foster, Porrello *et al.* 2013).

Da im allgemeinen Muskelgewebe das am stärksten durchblutete Gewebe ist, könnte es allerdings auch sein, dass die Sequenzen von Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 eigentlich aus Blutzellen nachgewiesen wurden. Ein Argument dagegen wäre, dass die Autoren innerhalb ihrer Analysen auch Tas2r-RT-PCR-Nachweise aus isolierten, kultivierten Herzmuskelzellen und Fibroblasten durchführten. Inwieweit allerdings noch Leukozyten in einer solchen Präparation vorhanden sind, lässt sich schwer sagen. Der einzige zelluläre Beweis einer Tas2r-Expression in Herzzellen findet sich seitens der Autoren in einer *In-situ*-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von Tas2r121-mRNA in Herzgewebe (Abbildung 31; Foster, Porrello *et al.* 2013).

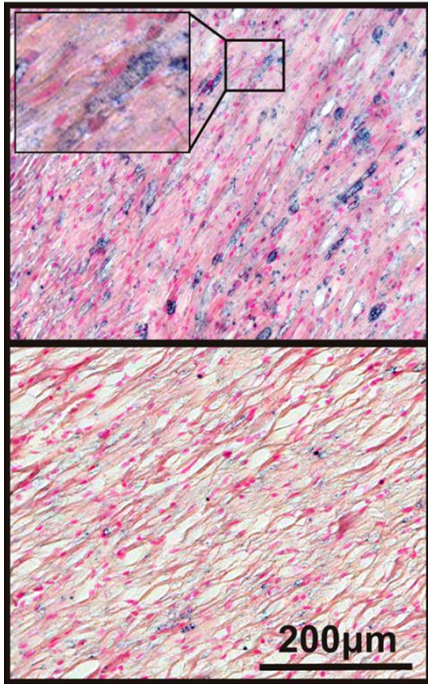


Abbildung 31 (links): ISH in Ratten-Herzgewebe zum Nachweis von Tas2r121. (Ausschnitt von Abbildung 3 aus Foster, Porrello et al. 2013)

Oben: blaue Markierung mittels Tas2r121-spezifischer *antisense*-Sonde; unten: keine Markierung unter Nutzung der Tas2r121-spezifischen *sense*-Sonde.

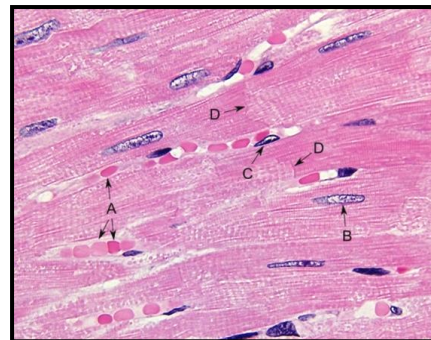


Abbildung 32: Vergleich – Färbung: Hämatoxylin und Eosin nach Gill. (Quelle: mikroskopie-forum.de) Objektiv: 63x 1.4 Öl.

A = Das Gewebe wird sehr gut mit Blut versorgt. Hier einige rote Blutzellen (Erythrozyten); B = Kern von einer Muskelzelle; C = Endothelzelle einer Kapillare; D = Glanzstreifen (*Disci intercalares*).

In ihren ISH-Experimenten sind deutliche Markierungen der Tas2r121-mRNA in Zellen des Herzgewebes zu erkennen. Die Zellidentität ist jedoch nicht eindeutig. Laut Morphologie könnten sich die Markierungen sowohl in Kernen der Herzmuskelzellen, in den Endothelzellen der Kapillaren, oder auch in Blutzellen befinden (Vergleich Abbildung 32 aus mikroskopie-forum.de). Für die in meinen Experimenten als in Blut exprimiert identifizierte Tas2r gibt es in der Publikation (Foster, Porrello *et al.* 2013) keinen zellulären Nachweis. Es bleibt also unsicher, ob Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 tatsächlich auch in herzwegebespezifischen Zellen, oder nur in einer Art von Blutzellen exprimiert werden. Nichtsdestotrotz wäre eine Rolle dieser Tas2r in regulatorischen Funktionen denkbar. Die in der Publikation beschriebenen Effekte unterschiedlicher Ernährungs-Situationen auf die Expressionsstärke der untersuchten Tas2r (Foster, Porrello *et al.* 2013) sprechen dafür. Für Tas2r120 und Tas2r121 scheint die Expression speziell in Herzmuskelzellen und Fibroblasten unzweideutiger.

In welchem Zelltyp des Blutes die Tas2r-mRNA vorkommt, lässt sich nur vermuten. Aus humanen Studien asthmatischer Patienten, ist bekannt, dass vor allem Lymphozyten TAS2R-mRNA aufweisen (James, Daham *et al.* 2012). Außerdem zeigten Transkriptom-Analysen in Leukozyten, dass Bittergeschmackrezeptoren in schwer asthmatischen Kindern hochreguliert sind (Orsmark-Pietras, James *et al.* 2013).

Wenn also Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 tatsächlich in einer Art Leukozyten exprimiert würden, sind alle RT-PCR-Nachweise dieser Rezeptoren in Geweben mit äußerster Vorsicht zu genießen. Ein zellulärer, gewebespezifischer Nachweis ist für diese Fälle unabdingbar.

Die erwähnte Expression der Untereinheiten Tas1r1 und Tas1r3 des Umamirezeptors in Blut unterstreichen dessen vermutete Rolle als weit verbreiteter Aminosäure-Sensor,

der jüngst als Sensor für den mTORC1-vermittelten Autophagie-Signalweg impliziert wurde (Wauson, Zaganjor *et al.* 2012).

Da *Tas1r1*- und *Tas1r3*-*Knock-out*-Mäuse vital sind und keine lebensbedrohlichen Einschränkungen zeigen (z. B. Damak, Rong *et al.* 2003; Zhao, Zhang *et al.* 2003; Voigt 2011; Voigt, Hübner *et al.* 2012), ist entweder keine essentielle Funktion des Umami-rezeptors in Blut, oder die Kompensation einer solchen durch andere Sensoren anzunehmen.

4.1.3.2 Nichtgustatorisches Zungenepithel

Über die Expression von Bittergeschmacksrezeptoren im nichtgustatorischen Zungenepithel ist aus der Literatur bisher nichts bekannt. Innerhalb der vorliegenden Arbeit stellte sich heraus, dass von Rezeptoren, die in Blut exprimiert sind, ebenfalls im nichtgustatorischen Zungenepithel mRNA nachweisbar ist (Abbildung 16 und Tabelle 36). Auch mRNA-Sequenzen der Umami-rezeptor-Untereinheiten *Tas1r1* und *Tas1r3* und von NTPDase2 sind dort zu finden. Für *Tas2r126*, *Tas2r135* und *Tas2r143*, sowie *Tas1r1* erweisen sich die Expressionslevel in nichtgustatorischem Epithel im Vergleich zu Blut sehr ähnlich (Abbildung 16 und Tabelle 36). Dies könnte bedeuten, dass deren dort gemessene mRNA-Expression eigentlich auf dem Vorkommen in Blutzellen beruht. Dass es sich bei den Zellen um (eine Art von) Leukozyten handelte, wäre in diesem Fall wiederum möglich, weil diese in der Lage sind in das Gewebe einzuwandern und somit nach der beschriebenen Präparation (siehe 2.2.3.1, Seite 40) noch auffindbar wären. Die mRNA-Expressionslevel anderer Rezeptoren im nichtgustatorischen Zungenepithel weichen deutlich von denen im Blut ab (Tabelle 36). Dies betrifft, wie bereits diskutiert, *Tas2r108* (siehe 4.1.2.1). Aber auch *Tas2r137*-mRNA ist ~4,7-fach und *Tas1r3*-mRNA 7,1-fach höher in nichtgustatorischem Epithel, als in Blut exprimiert. Diese Rezeptoren (bzw. Rezeptoruntereinheit) könnten demzufolge entweder in Zellen des Zungenepithels selbst oder in Leukozyten exprimiert sein (siehe Diskussion über *Tas2r108* [4.1.2.1] und Blut [4.1.3.1]). Da *Tas2r118*-mRNA innerhalb der vorgestellten Versuche nur marginal und lediglich in einem von drei untersuchten Tieren im nichtgustatorischen Zungenepithel nachweisbar war (Abbildung 16 und Tabelle 36), lässt sich für diese Expression keine handfeste Evidenz ableiten. Eher ist bei dem Befund von einem Messartefakt auszugehen.

Die NTPDase2-mRNA-Expression im Geschmackspapillen-freien Zungenepithel sticht mit einem mehr als 100-fach höherem Level als in Blut heraus (Tabelle 36). Das spricht deutlich dafür, dass NTPDase2 in Epithelzellen der Zunge außerhalb der Geschmackspapillen exprimiert ist. Tatsächlich ist zwar NTPDase2 die einzige Ecto-ATPase innerhalb der Geschmacksknospen, dort nur in Typ I-Zellen zu finden und dort notwendig zur Degradierung von ATP und damit zum Verhindern einer Geschmacks-Desensibilisierung (Vandenbeuch, Anderson *et al.* 2013). Jedoch wurde die Expression von NTPDase2 auch schon in Fadenpapillen und im interpapillären Zungenepithel gezeigt (Li, Cao *et al.* 2012). Somit ist dieser Befund in Übereinstimmung mit der Literatur.

4.1.4 Tas2r-Expression in Geschmackspapillen der Zunge

Die bisher darlegten extragustatorischen Expressionsorte von Tas2r131 und Tas2r108, sowie erörterte Befunde aus der Literatur und die aufgezeigte Expression einiger Tas2r-mRNAs in Blut werfen die Möglichkeit auf, dass nicht alle 35 in der Literatur als funktionell beschriebenen Maus-Tas2r (Go, Satta *et al.* 2005; Shi und Zhang 2006; Li und Zhang 2013) gustatorische Aufgaben besitzen. Ein Hinweis auf eine tatsächliche gustatorische Funktion wäre deren Expression in Geschmacksknospen der Zungenpapillen. Innerhalb dieser Arbeit durchgeführte quantitative mRNA-Analysen (Bsp. 3.1.3.1.1, Seite 72) sowie zelluläre Nachweise der mRNA einiger Bitterrezeptoren (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r120, Tas2r126, Tas2r138, Tas2r143) bestätigen, dass mRNA-Sequenzen aller als funktionell charakterisierten Tas2r in mit Wall- und Blätterpapillen angereichertem (VP+FoP) Zungengewebe unterschiedlich stark exprimiert sind und diese somit befähigt sind als Geschmacksrezeptoren zu fungieren.

Innerhalb des VP+FoP-Gewebes unterscheiden sich individuelle Tas2r-mRNA-Expressionslevel ($2^{-\Delta CT}$ -Werte) deutlich voneinander und reichen, z. B. in C57BL/6-Mäusen, von 0,0001 bis zu 0,0105 (Tabelle 35, Seite 74). Dabei sind mit Tas2r137, Tas2r108, Tas2r135 und Tas2r126 auffällig gerade die Bitterrezeptoren am höchsten im Geschmacks-Epithel exprimiert, deren mRNA auch in Blut – wie bereits diskutiert eventuell in Leukozyten (4.1.3.1, Seite 119) – und ebenso in Geschmackspapillen-freiem Zungenepithel zu finden ist. Ein Vergleich (Tabelle 36 und Abbildung 17, ab Seite 77) offenbart allerdings, dass alle Bittergeschmacksrezeptoren deutlich höhere Expressionswerte im VP+FoP-Zungenepithel, als in Blut oder im nichtgustatorischen Zungenepithel aufweisen, was wiederum für die tatsächliche Expression der Rezeptoren in diesen Papillen spricht. Der direkte Beweis, dass auch die in Blut vorkommenden Tas2r-mRNA-Sequenzen wirklich in Geschmacksknospenzellen exprimiert sind, kommt von *In-situ*-Hybridisierungen (ISH) in Wallpapillen-Gewebeschnitten von C57BL/6-Mäusen (Abbildung 18, Seite 80). Exemplarisch für in Blut und nichtgustatorischem Zungenepithel exprimierte Bitterrezeptoren, kann hier die mRNA von Tas2r126 und von Tas2r143 direkt in Zellen der Geschmacksknospen nachgewiesen werden (Abbildung 18, Seite 80). Auch ist es möglich, exemplarisch mRNA-Sequenzen von Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118, Tas2r120, Tas2r138, sowie α -Gustducin mittels RNA-Sonden im Wallpapillen-Zungengewebe spezifisch nachzuweisen (Abbildung 18, Seite 80). Demzufolge kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass alle 35 als funktionell beschriebenen Bitterrezeptoren tatsächlich in Wall- bzw. Blätterpapillen exprimiert sind und dort höchstwahrscheinlich in den Geschmacksknospenzellen auch gustatorische Funktionen erfüllen. Jedoch sind die ebenfalls in Blut exprimierten Rezeptoren (Tas2r137, Tas2r108, Tas2r135, Tas2r126, sowie Tas2r143) innerhalb der Geschmacksknospen möglicherweise etwas geringer exprimiert, als es hier laut qRT-PCR in VP+FoP-Epithel den Anschein regt.

Bemerkenswert ist, dass unter den Maus-Bittergeschmacksrezeptoren extrem gering exprimierte, wie die in C57BL/6-Mäusen am schwächsten nachgewiesenen Tas2r114, Tas2r122 und Tas2r140 (Tabelle 35, Seite 74), existieren. Innerhalb der Bachelorarbeit

4 Diskussion

von Julia Freydank gelang es nicht, spezifische mRNA-Sequenzen dieser Rezeptoren auch zellulär in Wallpapillen-Gewebeschnitten nachzuweisen (Freydank 2012). Allerdings konnte Kristina Loßow in ihrer Doktorarbeit mittels Verstärkung Tas2r114-mRNA bzw. dessen Reporter in der Maus sehr schwach zellulär aufzeigen (Loßow 2011). Dort offenbarte sich, „dass der Rezeptor zumeist in unmittelbarer Nähe zur Geschmackspore lokalisiert und nur in vereinzelten Geschmacksknospen pro Gewebeschnitt nachweisbar war“ (Loßow 2011). So ist das schwache mRNA-Expressionslevel von Tas2r114 überzeugend und lässt sich mit einer äußerst raren Expression in Geschmacksknospenzellen erklären. Für Tas2r122 und Tas2r140 lassen sich folglich ähnliche Szenarios annehmen.

Auffallend ist außerdem, dass individuelle Tas2r-mRNA-Expressionsniveaus in unterschiedlichen Mauslinien zwar nicht identisch, jedoch tendenziell vergleichbar sind. Zum Beispiel weisen Tas2r131^{+/+}/R26^{+/*DTA*}-Mäuse (Wildtyp-Kontrolltiere) etwas andere mRNA-Expressionslevel ($2^{-\Delta CT}$ -Werte), als C57BL/6-Mäuse auf (Tabelle 40 und Abbildung 26, ab Seite 97). In VP+FoP-Zungenepithel dieser Mäuse sind – neben Tas2r114 – Tas2r122 ($0,0002 \pm 0,0001$), Tas2r144 ($0,0003 \pm <0,0001$), Tas2r115 ($0,0004 \pm <0,0001$), Tas2r136 ($0,0004 \pm 0,0001$) und Tas2r109 ($0,0005 \pm 0,0001$) am geringsten exprimiert. Die höchste mRNA-Expression innerhalb der Bitterrezeptoren weist in den Tas2r131^{+/+}/R26^{+/*DTA*}-Tieren, mit einem $2^{-\Delta CT}$ -Wert von $0,0098 \pm 0,0015$, Tas2r118 auf (Tabelle 40 und Abbildung 26). Dessen Expressionsniveau setzt sich dort, anders als den BL/6-Mäusen ($0,0075 \pm 0,0019$), deutlich von den weiteren stark exprimierten Tas2r (137, 108, 138, 136, 126) ab, die hier nur $2^{-\Delta CT}$ -Werte von $0,0042$ – $0,0053$ aufweisen. Tas2r131^{+/+}/R26^{+/*DTA*}-Tiere besitzen einen genetischen Mischhintergrund, der ursächlich für diese Unterschiede zu den C57BL/6-Mäusen sein könnte. So könnten zwischen den Mausstämmen, die einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund besitzen, z. B. die bereits in der Einleitung (1.3.4, Seite 14) beschriebenen Genvariationen, wie SNPs, besonders zum Tragen kommen (Whitney und Harder 1986; Capeless, Whitney *et al.* 1992) und zu einer verschiedenartigen Ausprägung der *Tas2r* führen. Aber auch innerhalb der Tas2r131^{+/+}/R26^{+/*DTA*}-Mäuse, welche relativ hohe individuelle Standardabweichungen in den $2^{-\Delta CT}$ -Werten (\pm SD) aufweisen, könnten – ebenso durch genetische Variation im inhomogenen genetischen Hintergrund – Expressionsunterschiede auftreten.

Tendenziell sind jedoch in beiden Mauslinien (C57BL/6 und Tas2r131^{+/+}/R26^{+/*DTA*}) dieselben Tas2r-mRNA-Sequenzen immer entweder eher niedrig oder eher stark in VP+FoP-Epithel exprimiert. Zum Vergleich und zur Verdeutlichung wurde eine Übersicht erstellt, in der Expressionsunterschiede farblich eingeordnet sind (Tabelle 41).

Tabelle 41: Vergleich der mRNA-Expressionsniveaus von Geschmacksrezeptoren und α -Gust-ducin in VP+FoP-Epithel von C57BL/6- und Tas2r131^{+/+}/R26^{+DTA}-Mäusen.

Relative (n-fache) Expression zu β -Aktin in C57BL/6 aufsteigend nach 2 ^{-ΔCT} -Wert			Relative (n-fache) Expression zu β -Aktin in Tas2r131 ^{+/+} /R26 ^{+DTA} nach Reihenfolge von C57BL/6		
Untersuchte Sequenz	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	\pm SD	Untersuchte Sequenz	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	\pm SD
Tas2r114	0,0001	<0,0001	Tas2r114	0,0005	<0,0005
Tas2r140	0,0002	<0,0001	Tas2r140	0,0007	0,0002
Tas2r122	0,0002	0,0001	Tas2r122	0,0002	0,0001
Tas2r109	0,0005	0,0002	Tas2r109	0,0005	0,0002
Tas1r1	0,0008	0,0002	Tas1r1	0,0008	0,0003
Tas2r136	0,0008	0,0004	Tas2r136	0,0004	0,0003
Tas2r131	0,0009	0,0002	Tas2r131	0,0022	0,0022
Tas2r144	0,0009	0,0003	Tas2r144	0,0003	0,0001
Tas2r120	0,0010	0,0001	Tas2r120	0,0024	0,0011
Tas2r107	0,0010	0,0003	Tas2r107	0,0010	0,0004
Tas2r115	0,0010	0,0003	Tas2r115	0,0004	0,0001
Tas2r119	0,0011	0,0003	Tas2r119	0,0019	0,0006
Tas2r103	0,0014	0,0006	Tas2r103	0,0010	0,0003
Tas2r124	0,0015	0,0009	Tas2r124	0,0007	0,0003
Tas2r123	0,0017	0,0003	Tas2r123	0,0010	0,0003
Tas2r130	0,0019	0,0008	Tas2r130	0,0012	0,0006
Tas2r143	0,0019	0,0009	Tas2r143	0,0009	0,0002
Tas2r125	0,0020	0,0013	Tas2r125	0,0013	0,0006
Tas2r117	0,0020	0,0004	Tas2r117	0,0024	0,0009
Tas2r134	0,0022	0,0010	Tas2r134	0,0013	0,0006
Tas2r113	0,0023	0,0005	Tas2r113	0,0016	0,0009
Tas2r129	0,0026	0,0016	Tas2r129	0,0012	0,0004
Tas2r110	0,0026	0,0008	Tas2r110	0,0017	0,0005
Tas2r102	0,0033	0,0029	Tas2r102	0,0018	0,0013
Tas2r105	0,0033	0,0011	Tas2r105	0,0035	0,0014
Tas2r121	0,0043	0,0016	Tas2r121	0,0020	0,0005
Tas2r138	0,0043	0,0011	Tas2r138	0,0044	0,0024
Tas2r116	0,0049	0,0012	Tas2r116	0,0038	0,0019
Tas2r106	0,0050	0,0002	Tas2r106	0,0026	0,0011
Tas2r139	0,0055	0,0028	Tas2r139	0,0030	0,0009
Tas2r104	0,0057	0,0014	Tas2r104	0,0035	0,0009
Tas2r118	0,0075	0,0019	Tas2r118	0,0098	0,0037
Tas2r126	0,0088	0,0036	Tas2r126	0,0042	0,0018
Tas1r3	0,0091	0,0037	Tas1r3	0,0078	0,0033
Tas2r135	0,0094	0,0052	Tas2r135	0,0042	0,0006
Tas2r108	0,0095	0,0057	Tas2r108	0,0053	0,0012
Tas2r137	0,0105	0,0036	Tas2r137	0,0047	0,0020
Tas1r2	0,0168	0,0037	Tas1r2	0,0106	0,0068

<0,001, 0,001-<0,002, 0,002-<0,003, 0,003-<0,004, 0,004-<0,005, 0,005-<0,01, >0,01

Auch die mRNA-Sequenzen exemplarisch untersuchter Bitterrezeptoren (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r114, Tas2r118, Tas2r120 und Tas2r138), sowie Tas1r1, und α -Gustducin in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen sind generell vergleichbar stark exprimiert, wie in C57BL/6-Mäusen (Abbildung 20, Seite 85). Allein Tas2r131-mRNA kann in den homozygoten Tas2r131-*Knock-out*-Tieren nicht nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 38, Seite 86), was ferner die Funktionalität des *Knock-outs* bestätigt. Die meisten Expressionslevel ($2^{-\Delta C_T}$ -Werte) in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen sind zwar tendenziell etwas höher als in BL/6-Mäusen (Tabelle 38), schwach signifikant ist diese Beobachtung jedoch nur für Tas2r120 (Tabelle 38). In Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen, die nach der sechsten Rückkreuzung einen genetischen C57BL/6-Hintergrund von $\sim 96,9\%$ besitzen, könnten somit die Bittergeschmacksrezeptoren grundsätzlich marginal stärker ausgeprägt sein.

Insgesamt scheinen im VP+FoP-Zungenepithel individuelle Bittergeschmacksrezeptoren geringer exprimiert zu sein, als der Süßgeschmacksrezeptor. So erreicht die spezifische Süßrezeptor-Untereinheit, Tas1r2, in C57BL/6-Mäusen unter den Tas1r-mRNAs das höchste Expressionslevel ($0,0168 \pm 0,0037$) und ist damit $\sim 1,6$ mal so hoch exprimiert als der am stärksten exprimierte Bittergeschmacksrezeptor, Tas2r137 (Tabelle 35, Seite 74). Das Expressionsniveau von Tas1r3 liegt mit einem mittleren $2^{-\Delta C_T}$ -Wert von $0,0091 \pm 0,0057$ im Bereich der am stärksten exprimierten Bittergeschmacksrezeptor-mRNA-Sequenzen. Bekannt ist, dass in der murinen Wallpapille sowohl Tas1r2, als auch Tas1r3 in relativ vielen Zellen, deren Anzahl vergleichbar mit der von α -Gustducin-positiven Zellen ist, exprimiert werden, jedoch nur zu einem geringen Anteil auch mit α -Gustducin ko-exprimiert sind (Kim, Kusakabe *et al.* 2003).

Im Vergleich zu den Bitterrezeptoren niedrig exprimiert hingegen ist im BL/6-VP+FoP-Zungenepithel mit $0,0008 \pm 0,0002$ die spezifische Umamirezeptor-Untereinheit, Tas1r1 (Tabelle 35, Seite 74). Literatur und eigene Beobachtungen lassen darauf schließen, dass Tas1r1 innerhalb der Wall- und Blätterpapillen in vielen Zellen sehr schwach und nur in vereinzelt Zellen relativ stark (Vergleich mCherry-Reporter, 4.1.1.1, Seite 110) exprimiert ist (Hoon, Adler *et al.* 1999; Kim, Kusakabe *et al.* 2003; Voigt 2011; Voigt, Hübner *et al.* 2012). Dessen Bedeutung bleibt zu klären.

Generell weisen Bittergeschmacksrezeptoren eine eher niedrige mRNA-Expression auf. Ihre Expressionsstärke ist sowohl im C57BL/6- (Abbildung 14, Tabelle 35, ab Seite 73), als auch im Tas2r131^{BLiG/BLiG}- (Abbildung 20 und Tabelle 38 ab Seite 84) oder auch im Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}-VP+FoP-Zungenepithel (Tabelle 40 und Abbildung 26, ab Seite 97) immer in etwa fünffach niedriger als die von α -Gustducin.

Zusammenfassend werden verschiedene Bittergeschmacksrezeptor-mRNA-Sequenzen nicht nur unterschiedlich stark in Geschmackspapillen exprimiert, sondern scheinen auch unterschiedlich stark und in ungleich vielen Zellen der Wallpapille nachweisbar, wie exemplarisch acht dieser Rezeptor-mRNAs deutlich machten.

Diese Befunde weisen somit auf eine inhomogene Expression von Bitterrezeptoren in den Tas2r exprimierenden Zellen hin. Diese soll im Folgenden genauer diskutiert werden.

4.2 Expressionsmuster von Maus-Bitterrezeptoren in Geschmacksrezeptorzellen

Einvernehmlich hat in der Literatur Bestand, dass entsprechend der Expression ihrer G-Protein-gekoppelten Rezeptoren unterschiedliche Geschmacksrezeptorzelltypen in der Lage sind, die verschiedenen Geschmacksqualitäten süß, umami oder bitter wahrzunehmen (Adler, Hoon *et al.* 2000; Nelson, Hoon *et al.* 2001; Zhang, Hoon *et al.* 2003; Mueller, Hoon *et al.* 2005). Somit wird ferner allgemein vermutet, dass, wenn wiederum Bittergeschmacksrezeptoren innerhalb ihrer exprimierenden Zellen geordnet auf Subtypen verteilt wären, eine Unterscheidung verschiedener Bitterstoffe möglich wäre. Eine heterogene Expression der Gesamtheit ihrer Bittergeschmacksrezeptoren ist tatsächlich mittlerweile bereits in Geschmackspapillen von Rhesusaffen (Ishimaru, Abe *et al.* 2012) und vom Menschen (Behrens, Foerster *et al.* 2007) gezeigt worden. Auch im Modellorganismus Maus gibt es etliche Hinweise auf eine solche Anordnung (Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000; Caicedo und Roper 2001; Yoshida, Miyauchi *et al.* 2009). Systematisch wurde diese Annahme in der Maus jedoch bisher noch nicht bestätigt und ist umstritten (siehe Einleitung 1.3.5.2, Seite 19). Um diese offene Frage zu erschließen, erfolgten in der vorliegenden Arbeit detaillierte Untersuchungen zu Bitterrezeptor-Expressionsmustern in Wall- und Blätterpapillen (VP+FoP) von Mäusen, im Hinblick auf die mögliche Existenz von spezifischen Tas2r exprimierenden Zellsubpopulationen. So wurden Ko-Expressionsstudien in zwei unterschiedlichen, gezielt im Tas2r131-Locus genetisch modifizierten Mauslinien (2.1.10.1, 2.1.10.3, 2.1.10.4, Seite 33) durchgeführt.

4.2.1 Tas2r131 innerhalb der Geschmacksrezeptorzellen

Repräsentativ wurde der in VP+FoP-Zungenepithel, im Vergleich zu anderen Tas2r, gering bis mittel exprimierte Bittergeschmacksrezeptor Tas2r131 gewählt, um dessen Verteilung innerhalb der Zellen in der Geschmacksknospe und seine Ko-Expression mit anderen Bitterrezeptoren zu erforschen. Da für Maus-Tas2r keine funktionellen Antikörper existieren, wurde zur zellulären Darstellung dieser entweder innerhalb der Mauslinie Tas2r131^{BLiG} hrGFP als Tas2r131-Reporter genutzt, oder generell für alle Tas2r deren mRNA-Sequenz innerhalb von *In-situ*-Hybridisierungen markiert.

4.2.1.1 Bi-allelische Expression

Generell ist davon auszugehen, dass Tas2r131, sowie ebenfalls alle Bitterrezeptoren, bi-allelisch exprimiert werden. Ein Beleg dafür findet sich z. B. in qRT-PCR-Experimenten. In Kontrolltiergruppe Tas2r131^{+/BLiG}/R26^{+/+}, welche sich durch heterozygoten *Knock-out* des gen-kodierenden Tas2r131-Locus auszeichnet, zeigt sich eine etwa 0,5-fache mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe Tas2r131^{+/+}/R26^{+/DTA}, in der der Bitterrezeptor Tas2r131 nicht manipuliert ist (Abbildung 25, Tabelle 39, ab Seite 94).

Außerdem weisen heterozygote und homozygote Mäuse der Linie Tas2r131^{BLiG} jeweils gleiche Zahlen an hrGFP-positiven Zellen in Geschmackspapillen auf (Voigt 2011).

4.2.1.2 Tas2r131 exprimierende Zellen als Subpopulation aller Bittergeschmacksrezeptorzellen

Ein Hinweis auf Tas2r exprimierende Zellsubpopulationen wäre es, wenn Tas2r131 nicht in allen existierenden Bittergeschmacksrezeptorzellen exprimiert würde. Dies diente als Ansatzpunkt für Erforschung der Tas2r-Ko-Expression.

In VP und FoP von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen bildet die insgesamt 12% große Tas2r131-Zellpopulation eine Subpopulation ausschließlich α -Gustducin-Protein exprimierender Zellen (3.2.1.1, Seite 81). So machen die hrGFP-Zellen in VP etwa 50% \pm 5% bzw. in FoP 52% \pm 7% der α -Gustducin-Zellen aus. Generell konnte für Bitterrezeptoren der murinen Wallpapille bereits gezeigt werden, dass deren mRNA selektiv innerhalb einer Subpopulation von α -Gustducin-Zellen vorkommt (Adler, Hoon *et al.* 2000). Darüber hinaus sollen 87% aller α -Gustducin-Zellen Tas2r ko-exprimieren (Kim, Kusakabe *et al.* 2003). Bzw. beträgt in BL/6-Mäusen der Anteil an α -Gustducin-Zellen, die in VP Tas1r-Proteine exprimieren, 18% (Stone, Barrows *et al.* 2007). In diesem Fall blieben 82% α -Gustducin exprimierende Zellen, die auch Tas2r aufweisen könnten. Legt man diesen Wert den eigenen Ergebnissen zugrunde, setzt also 82% der α -Gustducin-Zellen als Gesamt-Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulation auf 100% (siehe Abbildung 33), existieren in VP und FoP im Mittel 62% Bitterzellen, die hrGFP (Tas2r131) exprimieren ($51\%/82\% = x/100\%$; $x = 62,2\%$). Das bedeutete wiederum, dass es noch weitere, zusätzlich zu Tas2r131 exprimierenden Bitterrezeptorzellen geben muss ($\sim 38\%$).

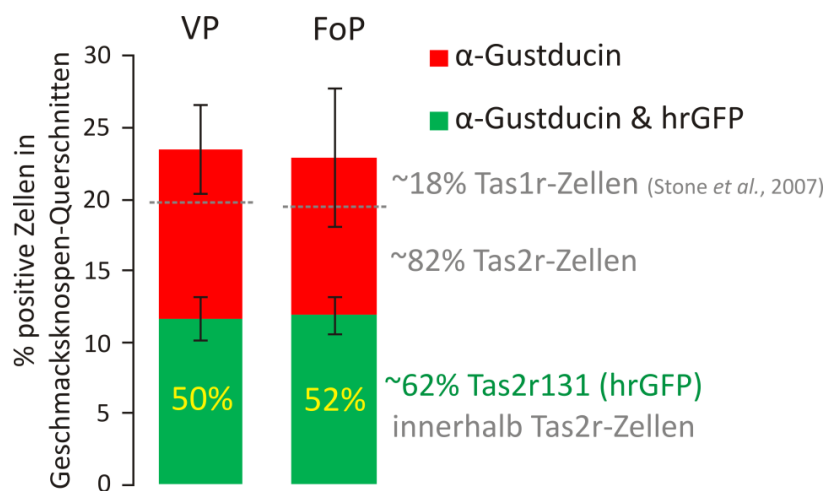


Abbildung 33: Tas2r131 exprimierende Zellen bilden eine Subpopulation von $\sim 62\%$ der Bitterrezeptor-Zellen. Unter Zuhilfenahme von Daten Tas1r exprimierender α -Gustducin-Zellen der Wallpapille (VP) aus der Literatur (Stone, Barrows *et al.* 2007), konnte die Fraktion von Tas2r131 exprimierenden Bittergeschmacksrezeptorzellen auf \emptyset rund 62% in VP und FoP berechnet werden ($51\%/82\% = x/100\%$; $x = 62,2\%$).

Auf Protein-Ebene ist α -Gustducin selbst in rund 23% \pm 3–5% aller Geschmacksknospenzellen innerhalb der VP bzw. FoP auffindbar (Abbildung 19, Seite 83). Vergleichbar viele Zellen der VP enthalten auch α -Gustducin-mRNA: In Tas2r131^{BLiG/BLiG}- und Tas2r131^{+/+}/R26^{+ /DTA}-Mäusen (3.2.1.3, Seite 85 und 3.2.2.4, Seite 101) ist α -Gustducin-mRNA im Mittel in rund 19% \pm 5% aller Geschmacksknospenzellen nachweisbar. Geringe Abweichungen zu α -Gustducin-Protein-positiven Zellen liegen innerhalb der Stan-

dardabweichungen. Somit kann in den Geschmacksknospenzellen von der α -Gustducin-mRNA-Expression auch auf das Vorhandensein des α -Gustducin-Proteins geschlossen werden. Der so hier nach bestem Wissen erstmals in Mäusen genau bestimmte Anteil α -Gustducin exprimierender Zellen innerhalb der VP- und FoP-Geschmacksknospen von im Mittel 21% ähnelt dem in Ratten. Dort beträgt die Anzahl α -Gustducin exprimierender Zellen in VP-Geschmacksknospen rund 24% (Ueda, Fujii *et al.* 2003).

Auch bestätigt sich in der VP von Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen exakt eine hrGFP-Zellsubpopulation, die 50% der α -Gustducin-Zellen ausmacht, wenn dort die α -Gustducin exprimierenden Zellen auf mRNA-Ebene ermittelt werden (Abbildung 21, Seite 87). Wird die Überlappung von Tas2r131- mit α -Gustducin-mRNA exprimierenden Zellen in Tas2r131-Zellablations-Studien nach ISH rein rechnerisch bestimmt (Abbildung 27, Seite 102), beträgt die Tas2r131-Subpopulation etwa 37%. Dieser etwas geringere Wert könnte mit minimalen Schwankungen in den unterschiedlichen Auszählungen begründet sein: So wurden in Tas2r131^{+/-}/R26^{+/-DTA}-Mäusen im Mittel absolut $1,79 \pm 0,33$ Tas2r131-mRNA-positive Zellen pro Geschmacksknospenquerschnitt gezählt (siehe Tabelle 44 im Anhang, Seite 166). Nur geringfügig höher ist mit $2,16 \pm 0,33$ der Mittelwert der hrGFP-Reporterprotein-positiven Zellen (siehe Tabelle 37, Seite 82). Da die Abweichungen zwischen Tas2r131- und hrGFP-positiven Zellen nahezu in den Standardabweichungen liegen, kann auch hier davon ausgegangen werden, dass man mit der hrGFP-Expression auf die Tas2r131-mRNA-Expression schließen kann und umgekehrt. Da, wie für alle Tas2r, auch für Tas2r131 bisher kein funktionierender Antikörper existiert, ist dies ein wichtiger Befund. Denn mit den hier angewandten Nachweismethoden ist in Geschmacksknospen eine Tas2r131-Expression zuverlässig darstellbar.

Innerhalb der qRT-PCRs ist das α -Gustducin-Expressionslevel nach Tas2r131-Zellablation um 65,4% reduziert (Tabelle 40, Seite 97) und lässt damit eine Tas2r131-Zellsubpopulation von ~65% der α -Gustducin-Zellen vermuten. Dies ähnelt dem, und bestätigt somit ebenso den, oben ermittelten Wert von ~62% der Tas2r131 exprimierenden α -Gustducin-Zellsubpopulation.

4.2.1.3 Tas2r-Ko-Expression mit Tas2r131

Nachdem Tas2r131-Zellen eine Subpopulation von ca. 62% aller Bittergeschmacksrezeptorzellen bilden, müssten also auch Zellen existieren, die zwar andere Tas2r, aber kein Tas2r131 exprimieren. In dieser Arbeit durchgeführte Tas2r131-Ko-Expressionsstudien (ab Seite 91) bestätigen diese Annahme. So sind z. B. (in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen) in heterogener Anzahl hrGFP-negative Zellen zu finden, die mRNA anderer Tas2r (Tas2r102, Tas2r105, Tas2r115, Tas2r118 oder Tas2r138) aufweisen (Abbildung 21, Seite 87). Wird die Tas2r131 exprimierende Zellpopulation darüber hinaus genetisch zerstört (ablatiert), kann zwar Tas2r131-mRNA selbst gar nicht mehr (Endpunkt-RT-PCR – Abbildung 24 und ISH – Abbildung 27) bzw. nur noch marginal detektiert werden (qRT-PCR – Abbildung 25 und Abbildung 26), was wiederum die Vernichtung der Tas2r131-Zellen bestätigt; weitere Tas2r-Sequenzen sind jedoch noch nachweisbar. Sie müssten demzufolge in anderen als den Tas2r131-Zellen exprimiert sein.

4 Diskussion

Auffällig in allen durchgeführten experimentellen Ansätzen, sind sich wiederholende Tas2r-Expressionshäufigkeiten, sowie deren immer gleichen Ko-Expressionsmuster mit Tas2r131 bzw. hrGFP:

Beispielsweise konnte in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen nach ISH gezeigt werden, dass hrGFP stets in der etwa gleichen Anzahl von Zellen je Geschmacksknospenquerschnitt auftritt (\emptyset 7,1% \pm 0,6, Abbildung 21, Seite 87). Diese hrGFP-Zellen ko-exprimieren wiederum unterschiedlich oft mRNA verschiedener Bitterrezeptoren, wobei jedoch jede individuelle Tas2r-mRNA immer in ähnlich vielen Zellen auftritt. Auch sind andere Tas2r-mRNAs zu immer denselben Anteilen mit Tas2r131 ko-exprimiert. Dies zeigt sich nicht nur bei deren Überlappung mit dem hrGFP-Protein in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen. Auch bestätigt sich ein vergleichbares Ko-Expressionsverhalten wiederholt in Mäusen, in denen alle Tas2r131-Zellen ablatiert wurden (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) auf mRNA-Ebene [zunächst in Endpunkt- (3.2.2.2, Abbildung 24, Seite 92), dann in quantitativen RT-PCR-Analysen (3.2.2.3, Abbildung 25 und Abbildung 26, ab Seite 94), sowie schließlich in zellulären Nachweisen mittels ISH (3.2.2.4, Abbildung 27, Seite 102)]. Zur Verdeutlichung werden die Ko-Expressionswerte aus den Ergebnissen der wesentlichen Experimente zusammenfassend (ISH in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen, sowie ISH und qRT-PCR in Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}-Mäusen) untereinander in Abbildung 34 dargestellt.

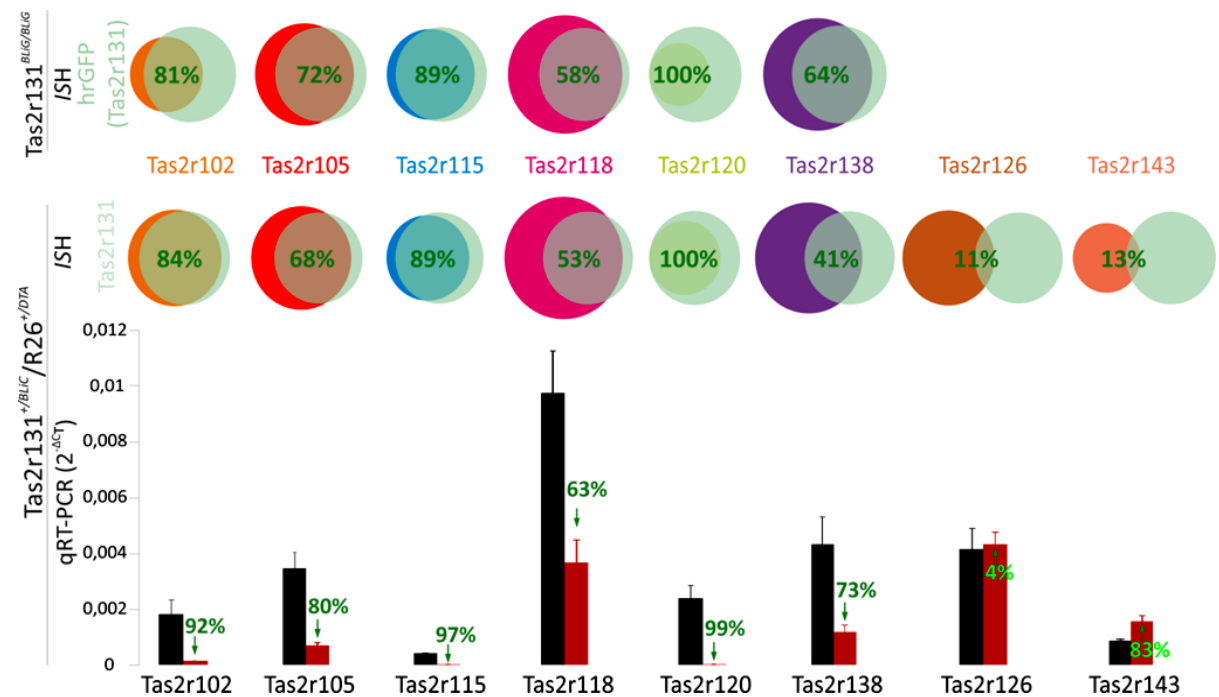


Abbildung 34: Ein Vergleich der Tas2r-Ko-Expression mit Tas2r131 (grün in Prozent), aus drei verschiedenen experimentellen Ansätzen, belegt feste Tas2r-Ko-Expressionsmuster. Egal, ob Tas2r-mRNA-Ko-Expression direkt nach ISH mittels Tas2r131-Reporter, hrGFP (Mengendiagramme in oberer Reihe); oder indirekt durch Berechnung der Differenz zwischen Tieren mit Tas2r131-Zellablation und Kontrolltieren, entweder nach ISH (Mengendiagramme in zweiter Reihe), oder nach qRT-PCR (Balkendiagramme, unten) bestimmt wird, es ergeben sich immer ähnliche Tas2r-Ko-Expressionswerte mit Tas2r131. Dabei sind die Ergebnisse aus den ISH-Experimenten der Tas2r131^{BLiG/BLiG}- und Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}-Mäuse besonders gut vergleichbar. Aber auch qRT-PCRs in Geschmackspapillen-haltigem Zungengewebe zeigen gleiche Tendenzen. Es existieren demzufolge feste Tas2r-Ko-Expressionsmuster.

Mit diesen Experimenten wurde somit erstmals bewiesen, dass Tas2r-Expression innerhalb der Maus-Bittergeschmacksrezeptorzellen nicht nur heterogen ist, sondern auch in festen Mustern vorliegt.

So könnte die Existenz von Bittergeschmacksrezeptor exprimierenden Zellsubpopulationen ein fundamentales Prinzip in Säugetieren darstellen (Vergleich – Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000; Caicedo und Roper 2001; Behrens, Foerster *et al.* 2007).

Wird das Ausmaß der Ko-Expression aller funktionellen Bittergeschmacksrezeptoren mit Tas2r131 – vornehmlich anhand derer mRNA-Expressionslevel nach Tas2r131-Zellablation – betrachtet, fällt auf, dass es eine relativ große Überlappung der unterschiedlichen Tas2r-mRNA exprimierenden Zellpopulationen mit Tas2r131-Zellen gibt. Denn die meisten Tas2r-Expressionslevel sind nach Ablation stark bis moderat reduziert (Abbildung 26, Seite 100).

Zum Beispiel ist Tas2r120-mRNA, die in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen immer mit hrGFP ko-exprimiert ist, in Tieren mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/BLiC/R26^{+/DTA}}) mittels *ISH* gar nicht mehr und mit RT-PCR kaum noch nachweisbar (Abbildung 34). Das bedeutet, Tas2r120 scheint immer innerhalb der Tas2r131-Zellpopulation exprimiert zu sein. Darüber hinaus kann aus den *ISH*-Studien abgeleitet werden, dass Tas2r120 in weniger Zellen vorkommt, als Tas2r131. Demzufolge bilden Tas2r120 exprimierende Zellen also eine Tas2r131-Subpopulation.

Laut der RT-PCRs (Reduktion in Tas2r131^{+/BLiC/R26^{+/DTA}}-Mäusen $\geq 99\%$) scheinen ebenfalls sieben weitere Rezeptoren innerhalb der Tas2r131-Zellpopulation exprimiert zu sein: Tas2r103, Tas2r109, Tas2r110, Tas2r117, Tas2r123, Tas2r140 und Tas2r144 (Tabelle 40 und Abbildung 26, ab Seite 97). Somit gäbe es also (mit Tas2r131 und Tas2r120) insgesamt neun Tas2r, die in $\sim 62\%$ bzw. in weniger als 62% der Bitterzellen exprimiert werden.

Fast ausschließlich in anderen, als den Tas2r131-Zellen, scheinen dagegen Tas2r126 und Tas2r143 exprimiert zu sein. Beide Rezeptor-mRNA-Sequenzen sind nach der Ablation von Tas2r131 exprimierenden Zellen in *ISH*-Experimenten noch in beinahe genauso vielen Zellen auffindbar, wie in Wildtyp-Mäusen (Abbildung 28, Seite 103). Wobei Tas2r126-mRNA in mehr Zellen nachweisbar ist, als Tas2r131-mRNA, d. h., Tas2r126 exprimierende Zellen eine etwas größere Population, als Tas2r131-Bitterzellen zu bilden scheinen. Tas2r143-mRNA ist dagegen in weniger Zellen auffindbar, so bilden Tas2r143-Bitterzellen vermutlich eine kleinere Subpopulation. Eine berechnete Überlappung mit Tas2r131 exprimierenden Zellen bestünde für Tas2r126 lediglich zu 11%, für Tas2r143 zu 13%. Außerdem sind in qRT-PCR-Analysen die mRNA-Expressionslevel beider Rezeptoren nach Tas2r131-Zellablation im Vergleich zu Kontrolltieren nicht signifikant niedriger. Eher können für diese sogar leichte bis starke Erhöhungen festgestellt werden (+ 4,3% für Tas2r126, nicht signifikant ($p = 0,84$); + 83% für Tas2r143, signifikant ($p = 0,015$), siehe Abbildung 26 und Tabelle 40, ab Seite 97). Dies spricht wiederum dafür, dass beide Rezeptoren tatsächlich ausschließlich in anderen, als den Tas2r131-Zellen zu finden sind. Überdies wäre eine Kompensation der ablatierten Zellen durch andere Bitterzellen denkbar. D. h., es gäbe beispielsweise mehr Tas2r143

exprimierende Zellen, weil Tas2r131-Zellen fehlen. Anhand der ISH-Experimente lässt sich diese Möglichkeit allerdings nicht bestätigen.

Für Tas2r134 und Tas2r135 sind die Reduktionen ihrer mRNA-Expressionslevel nach Tas2r131-Zellablation eher als unbedeutend einzuschätzen (- 34,3% für Tas2r134, nicht signifikant [$p = 0,527$]; - 33,5% für Tas2r135, nur schwach signifikant [$p = 0,026$], Abbildung 26 und Tabelle 40). So kann man davon ausgehen, dass auch diese beiden Rezeptoren zu einem Großteil in anderen, als den Tas2r131-Bitterzellen zu finden sind. Somit würden insgesamt vier Bitterrezeptoren (Tas2r126, Tas2r134, Tas2r135 und Tas2r143) existieren, die gar nicht bis nur geringfügig mit Tas2r131 ko-exprimiert sind. Dieser Effekt ist auch für die Tas1r-mRNA-Expression zu beobachten, die Ablation der Tas2r131-Zellpopulation scheint keine Auswirkungen auf die Tas1r-Expression zu haben (Tabelle 39). Das bestätigt abermals, dass in Mäusen Tas1rs in anderen als den Bitterzellen - zumindest in anderen als den Tas2r131 exprimierenden - ausgeprägt werden und ist damit einhergehend mit der Literatur (Adler, Hoon *et al.* 2000).

Alle weiteren 22 Tas2r sind moderat bis stark mit Tas2r131 ko-exprimiert (Tabelle 40). So scheinen laut RT-PCRs (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}-Mäuse) zwei Rezeptoren (Tas2r108 und Tas2r137) 30%-60% in Tas2r131-Zellen ko-exprimiert, acht (Tas2r104, Tas2r105, Tas2r106, Tas2r114, Tas2r118, Tas2r130, Tas2r138 und Tas2r139) 60%-90% und zwölf Tas2r (Tas2r102, Tas2r107, Tas2r113, Tas2r115, Tas2r116, Tas2r119, Tas2r121, Tas2r122, Tas2r124, Tas2r125, Tas2r129 und Tas2r136) zu 90%-99%.

Anhand der Erkenntnis, dass somit insgesamt 30 der 35 Maus-Bitterrezeptoren zu verschiedenen Anteilen mit Tas2r131 in denselben Zellen vorkommen können und der Tatsache, dass Tas2r131 exprimierende Zellen eine Bitterzell-Subpopulation von 62% bilden, stellt sich nun die Frage, was für definierte Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen es gibt. Wie viele Tas2r kommen wohl in einer Bitterzelle tatsächlich vor und wie viele Kombinationsmöglichkeiten der verschiedenen Tas2r existieren demzufolge innerhalb einer Zelle?

4.2.2 Definierte Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen

Bislang ist für Mäuse nicht bekannt, wie viele Bittergeschmacksrezeptoren pro Zelle exprimiert werden. Bisherige Daten aus der Literatur ließen vermuten, dass eine Maus-Bittergeschmacksrezeptorzelle die meisten, wenn nicht sogar alle Tas2r exprimiert (Adler, Hoon *et al.* 2000). Im humanen Organismus wurde dagegen bereits gezeigt, dass es offenbar nicht mehr als vier bis elf Bittergeschmacksrezeptoren pro Bitterzelle gibt (Behrens, Foerster *et al.* 2007). Da unlängst auch in Rhesusaffen bestätigt wurde, dass jede Bitterzelle verschiedene Kombinationen von TAS2R-mRNAs exprimiert (Ishimaru, Abe *et al.* 2012), kann auch hier eine begrenzte Anzahl von Bitterrezeptoren pro Zelle bzw. die Existenz von Tas2r-Zellsubpopulationen angenommen werden.

Die vorangehend diskutierten stabilen Expressionsmuster der Maus-Tas2r lassen nun auch für Mäuse eine limitierte Anzahl an Bittergeschmacksrezeptoren pro Bitterzelle erwarten. Vielmehr noch: Da scheinbar immer dieselben Tas2r ko-exprimiert sind, ist

auch eine nicht-zufällige Anzahl an Bitterrezeptoren pro Zelle anzunehmen. Es scheinen definierte Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen zu existieren.

Von den auf zellulärer Ebene untersuchten Bitterrezeptoren ist Tas2r118 der am häufigsten exprimierte. Dessen mRNA kommt im Mittel in $13,7\% \pm 1,3\%$ der Zellen je Geschmacksknospenquerschnitt vor. (Dieser Wert kann hier aus zwei Experimenten mit drei Auszählungen ermittelt werden: $12,6\%$ in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen [Abbildung 21, Seite 87]; $15,1\%$ in Tas2r131^{+/BLiC/R26+/DTA}- und $13,3\%$ der Zellen in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Mäusen [Abbildung 28, Seite 103].) Innerhalb vergleichbarer Experimente ist Tas2r143 – von den zellulär untersuchten – der am seltensten exprimierte Bitterrezeptor. Dieser ist in durchschnittlich $4,85\% \pm 0,21\%$ der Geschmacksknospenzellen (Abbildung 28, Seite 103) zu finden. Interessant ist, dass darüber hinaus auch die mRNA des offensichtlich zellulär am häufigsten vorkommenden Bitterrezeptors, Tas2r118, innerhalb des VP+FoP-Zungengewebes am stärksten exprimiert ist. Demgegenüber ist Tas2r143-mRNA, des von den zellulär untersuchten am seltensten vorkommenden Bitterrezeptors, innerhalb des Geschmackspapillengewebes sehr schwach nachzuweisen. Diese Beobachtung scheint allgemeingültig zu sein, da Bitterrezeptoren mit schwächerem mRNA-Expressionslevel in Geschmackspapillen-haltigem Zungengewebe auch seltener in einzelnen Geschmacksknospen-Zellen exprimiert sind. Dagegen weist ein stärkeres Expressionslevel meist auf eine häufigere Expression hin.

4.2.2.1 Vergleich: mRNA-Expressionslevel und -Expressionshäufigkeit

Es scheint daher eine Korrelation zwischen mRNA-Expressionslevel und -häufigkeit zu bestehen. Mittelt man alle erhobenen Tas2r-Expressionswerte von Tas2r-Wildtyp-Mäusen (C57BL/6, Tas2r131^{BLiG/BLiG} [ohne Tas2r131] und Tas2r131^{+/+/R26+/DTA}) sowie der Expressionshäufigkeiten ($2 \times$ Tas2r131^{BLiG/BLiG} [hrGFP] und Tas2r131^{+/+/R26+/DTA}), und prüft dann die *Pearson*-Korrelation, bestätigt sich diese Hypothese.

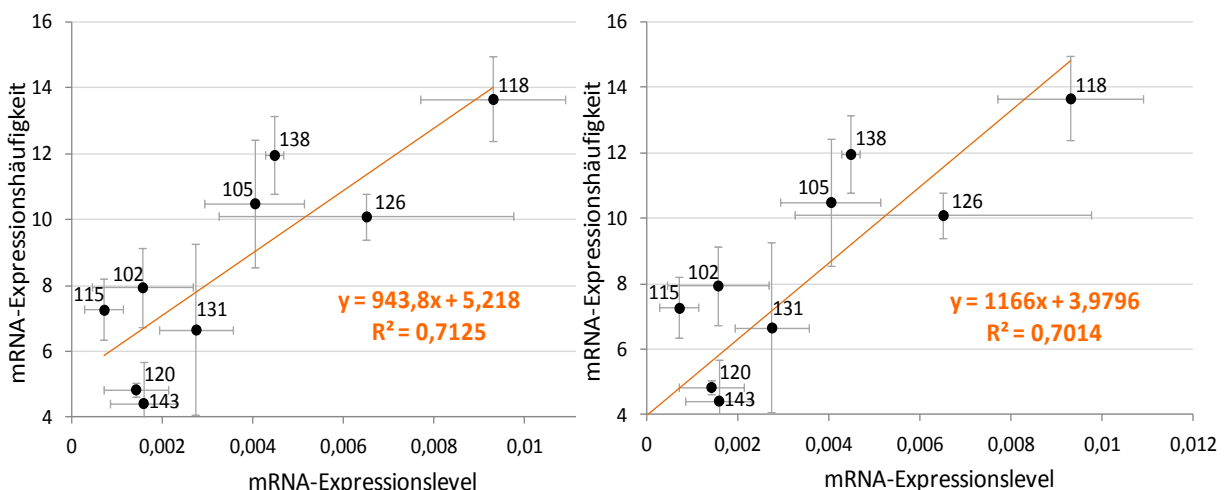


Abbildung 35: Korrelation zwischen mRNA-Expressionshäufigkeit (mRNA positive Zellen [%]) und -Expressionslevel (relative Expression [$2^{-\Delta C_T}$]). Links: Aufgetragen wurden gemittelte Werte aller Wildtyp-Expressionen \pm SD (Werte siehe Tabelle 45, Seite 169). Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der *Pearson*-Korrelation beträgt 0,71. Rechts: Zugefügt wurde der theoretische Wert 0 -mRNA-Expressionslevel, 0 -Häufigkeit. Das Bestimmtheitsmaß (R^2) der *Pearson*-Korrelation beträgt 0,70.

Es gibt einen wahrscheinlichen ($p = 0,004$, Abbildung 39, Seite 171) linearen Zusammenhang ($R^2 = 0,71$) zwischen mRNA-Expressionslevel und -häufigkeit (Abbildung 35, links). Wird davon ausgegangen, dass bei einer nicht-messbaren mRNA-Expression auch keine Zellen mRNA aufweisen würden, d. h. Expressionslevel und -häufigkeit gleich Null wären, bleibt der lineare Zusammenhang bestehen ($R^2 = 0,70$, Abbildung 35, rechts).

4.2.2.2 Wie viele Tas2r könnten in einer Bitterzelle vorkommen?

Werden mit Hilfe des linearen Zusammenhangs zwischen mRNA-Expressionslevel und -häufigkeit ($y = 1166x + 3,9796$) alle nicht experimentell bestimmten Tas2r-Expressionshäufigkeiten extrapoliert, ergibt sich eine durchschnittliche Expression eines einzelnen Bitterrezeptors in 7,29% der Geschmacksknospenzellen (Tabelle 45, Seite 169). Dabei hätte laut Extrapolation Tas2r122 die geringste Expressionshäufigkeit von 4,21% (Tabelle 45). Tas2r118 ist mit 13,67% der am häufigsten in den Geschmacksknospenzellen exprimierte Tas2r. Wie bereits erwähnt, machen Bitterzellen laut Literatur insgesamt 82% der mittleren α -Gustducin-Expression (\emptyset 18,73%, siehe Tabelle 45, Stone, Barrows *et al.* 2007). Damit beträgt die Expressionshäufigkeit der Bitterzellen in einer Geschmacksknospe im Mittel 15,36% ($18,73\% / 100\% = x/82\%$; $x = 15,36\%$). Ginge man also theoretisch von einer gleichmäßigen und zufälligen Verteilung der Tas2r auf die Bitterzellen aus, würden sich somit bei 35 Bitterrezeptoren durchschnittlich 16,62 (also rund 17) Rezeptoren in einer Zelle befinden ($= 7,81\% * 35 / 15,36\%$). Weiter könnte man anhand der am seltensten bzw. am häufigsten vorkommenden Rezeptoren herleiten, dass sich randomisiert zwischen 9,59 (also mind. 9; $= 4,21\% * 35 / 15,36\%$) bis 31,15 (also etwa 31; $= 13,67\% * 35 / 15,36\%$) unterschiedliche Tas2r in einer Bitterzelle befinden könnten. Da allerdings verschiedene Tas2r-Zellsubpopulationen existieren und damit die Verteilung der Tas2r auf die Bitterzellen wahrscheinlich nicht gleichmäßig ist, bleibt ungewiss, ob es einzelne Tas2r-Subpopulationen gibt, die noch weniger als neun bzw. noch mehr als 31 Tas2r pro Zelle exprimieren.

Ginge man weiter von der zufälligen Kombination von durchschnittlich 17 unterschiedlichen (aus 35) Rezeptoren pro Bitterzelle aus, gäbe es nach der Rechnung $35! / ((35 - 17)! \times 17!)$ etwa 4.537.567.650, also rund $4,54 \times 10^9$ Kombinationsmöglichkeiten aller 35 Bittergeschmacksrezeptoren untereinander. Auch hier scheinen tatsächlich weitaus weniger als diese berechneten Ko-Expressionsmöglichkeiten von Bitterrezeptoren zu existieren, da – wie bereits gezeigt – manche Tas2r-mRNAs nie bzw. andere immer miteinander in derselben Zelle exprimiert werden. So sind z. B. Tas2r103, Tas2r109, Tas2r110, Tas2r117, Tas2r120, Tas2r123, Tas2r131, Tas2r140 bzw. Tas2r144 nie bis äußerst selten in denselben Zellen wie Tas2r126, Tas2r134, Tas2r135 oder Tas2r143 ko-exprimiert. Damit wären diese 36 Kombinationen ausgeschlossen bzw. äußerst rar. Immer ko-exprimiert scheint dagegen Tas2r131 mit Tas2r103, Tas2r109, Tas2r110, Tas2r117, Tas2r120, Tas2r123, Tas2r140 oder Tas2r144. D. h., es gäbe acht Tas2r, die immer in denselben Zellen vorkommen, in denen auch Tas2r131 ausgeprägt ist. Die acht untereinander müssen allerdings nicht immer miteinander kombiniert sein, da sie alle in kleineren Subpopulationen innerhalb der Tas2r131-Zellen exprimiert zu sein scheinen. Weniger Kombinationsmöglichkeiten und demzufolge auch eine geringere Zahl von

Bitterzellsubpopulationen sind überdies wahrscheinlich, da z. B. in der Wallpapille der Maus höchstens 45.000 Zellen überhaupt vorkommen (300 Geschmacksknospen (Voigt, Hübner *et al.* 2012) × bis zu 150 spezialisierte Zellen, siehe Einleitung 1.2, Seite 2).

4.2.2.3 Häufigkeit individueller Tas2r innerhalb der Bitterzellpopulation

Ebenso ist es möglich anhand der Expressionshäufigkeiten zu bestimmen, in welchem Anteil von Bitterzellen ein individueller Bitterrezeptor vorkommt. Geht man von insgesamt $18,7\% \pm 4,8\%$ α -Gustducin-mRNA exprimierenden Zellen (Tabelle 45, Seite 169) aus, würden davon beispielsweise die Tas2r118-mRNA exprimierenden Zellen eine Subpopulation von rund 73,0% ausmachen. Damit – werden die in 4.2.1.2 diskutierten Literaturbefunde zugrundegelegt – wäre Tas2r118 wiederum in 89% aller Bitterzellen exprimiert ($73\% / 82\% = x/100\%$; $x = 89,0\%$). Auch nach Betrachtung aller Tas2r-mRNA-Expressionshäufigkeiten ist demnach Tas2r118 der Bittergeschmacksrezeptor, welcher in den meisten Bitterzellen vorkommt. Tas2r143 bildete rechnerisch eine α -Gustducin-Subpopulation von nur 22,6% und wäre damit in rund 28% aller Bitterzellen exprimiert ($23\% / 82\% = x/100\%$; $x = 28,0\%$). Einer der in qRT-PCRs am geringsten exprimierten Rezeptoren, Tas2r114, ist nach Extrapolation rein rechnerisch in rund 27,7% der Bitterzellen existent (Tabelle 45, Seite 169). Da es jedoch für diesen Rezeptor nicht möglich war eine zelluläre Bestimmung durchzuführen, ist es wahrscheinlich, dass er in der Realität in noch weitaus weniger Zellen vorkommt. Allgemein gelten die hier bestimmten Werte für alle Tas2r-Subpopulationen (Tabelle 45) als Richtwerte. Nicht vergessen werden darf dabei, dass sie zum überwiegenden Teil durch die Untersuchung der Tas2r-mRNA erlangt wurden. Eine experimentelle Bestätigung der berechneten Expressionshäufigkeiten für jeden einzelnen Tas2r wäre wünschenswert.

Nichtsdestotrotz können anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Analysen individuelle Expressionshäufigkeiten der einzelnen Bitterrezeptoren erstmals wiederkehrend bewiesen werden. Fragt man nach einer Regel für die auftretende Häufigkeit eines individuellen Tas2rs, bleibt die Antwort schwierig. Bisher konnte beispielsweise kein Zusammenhang zwischen Häufigkeit und Ligandenspektrum (Loßow 2011; interne Kommunikation) eines Tas2rs hergestellt werden. Da sich aber, wie diskutiert, das mRNA-Expressionslevel mit der Häufigkeit eines Tas2rs in den Geschmacksknospenzellen korreliert, lohnt sich ein Blick auf die Tas2r-Gene.

4.2.3 Geordnete und regulierte *Tas2r*-Ko-Expression?

Wie in Abschnitt 1.3.4 (Seite 14) der Einleitung beschrieben, werden die Bitterrezeptoren durch individuelle Gene kodiert, welche in chromosomalen Clustern angeordnet sind (Adler, Hoon *et al.* 2000; Matsunami, Montmayeur *et al.* 2000; Andres-Barquin und Conte 2004). In der hier vorliegenden Arbeit kann demonstriert werden, dass die Ko-Expressionsmuster der Maus-*Tas2r* einem Schema nach ihrer chromosomalen Lage folgen, sodass nah beieinander liegende *Tas2r* offensichtlich ähnlich oft/stark mit *Tas2r131* ko-exprimiert werden (siehe 3.2.2.3, Abbildung 26, Seite 100).

4.2.3.1 Evolutionärer Hintergrund

Das ähnliche Ko-Expressionsverhalten chromosomal benachbarter *Tas2r* könnte evolutionäre Ursachen haben. Innerhalb Analysen individueller Loci in Säugern wurden schon öfters evolutionäre Zuwächse oder Verluste (Pseudogenisierung) von *Tas2r* dokumentiert (Parry, Erkner *et al.* 2004; Fischer, Gilad *et al.* 2005; Go, Satta *et al.* 2005; Sugawara, Go *et al.* 2011). Dabei wird angenommen, dass Nahrungs-Toxine den größten Selektionsdruck zur Ausbildung der Diversität der Säuger-*Tas2r* ausmachen (Li und Zhang 2013). So liegt es nahe, dass z. B. evolutionär durch Duplikationen (und Konversionen) entstandene *Tas2r*, die auch chromosomal dicht beisammen liegen (Conte, Ebeling *et al.* 2003; Shi, Zhang *et al.* 2003), sich hinsichtlich ihrer Expression ähnlich verhalten. Dies könnte so bei der Maus zutreffen und damit die beobachteten ähnlichen Ko-Expressionsverhalten der benachbarten *Tas2r* erklären. Tatsächlich existieren in Mäusen zwei Gen-Cluster, die wahrscheinlich in Anpassung an ihr variierendes pflanzliches Nahrungsspektrum, hauptsächlich durch positive Selektion nach Abspaltung von der humanen Linie, hervorgegangen sind (Shi, Zhang *et al.* 2003). Cluster 1 beinhaltet *Tas2r103*, *Tas2r109*, *Tas2r110*, *Tas2r117*, *Tas2r123*, *Tas2r125*, *Tas2r129* und *Tas2r140*. Diese Rezeptoren sind fast immer mit *Tas2r131* ko-exprimiert. Cluster 2 beherbergt *Tas2r104*, *Tas2r105*, *Tas2r106*, *Tas2r107* und *Tas2r114* (Shi, Zhang *et al.* 2003), Rezeptoren welche moderat bis stark mit *Tas2r131* ko-exprimiert sind. Beide Cluster gehören zu einer Gruppe (Gruppe A), die verschiedene *Tas2r*, wie z. B. *Tas2r131*, beherbergt, die sich wahrscheinlich speziesspezifisch nach dem Auseinanderlaufen der Primaten-Nager-Linie entwickelt haben (Shi, Zhang *et al.* 2003). Alle anderen *Tas2r* (Gruppe B und C) besitzen humane Eins-zu-eins-Orthologe und damit vermutlich auch konservierte Funktionen zwischen Maus und Mensch, und existierten wahrscheinlich schon vor dem Auseinanderlaufen der Primaten-Nager-Linie (Shi, Zhang *et al.* 2003). Dazu gehören *Tas2r108*, *Tas2r118*, *Tas2r119*, *Tas2r126*, *Tas2r134*, *Tas2r135*, *Tas2r137*, *Tas2r138*, *Tas2r143* und *Tas2r144* und damit hauptsächlich die Rezeptoren, die selten bis nie mit *Tas2r131* ko-exprimiert sind.

Somit könnte es also sein, dass es eine Verteilung verschiedener Bittergeschmacksrezeptoren hinsichtlich ihrer Expression auf unterschiedliche Zellen gibt, sodass eher konservierte von den speziesspezifischen *Tas2r* separiert werden. Wie würde aber ein solch unterschiedliches Expressionsverhalten verschiedener *Tas2r* reguliert?

4.2.3.2 Transkriptionelle Regulation?

Bereits bei der Entdeckung der *Tas2r*-Gene wurde vermutet, dass das „...Verpacken der *Tas2r*-Gene in Clustern diese befähigt gemeinsame regulatorische Sequenzen zu nutzen“ (Adler, Hoon *et al.* 2000). So liegt es nahe, dass chromosomal zusammenliegende *Tas2r* einem kollektiven Transkriptionsmuster folgen könnten. Dabei besteht die Möglichkeit, dass diese gemeinsam von denselben regulatorischen Sequenzen, wie *Enhancern*, *Silencern* oder Transkriptionsfaktoren, gesteuert würden.

Da manche Gen-kodierenden Sequenzen der *Tas2r* sehr nah beieinander liegen (siehe Chromosomenabschnitt 6F3, Abbildung 4, Seite 15), könnte es sogar sein, dass diese zum Teil gemeinsame Promotoren benutzen. Über die Promotor-Struktur der *Tas2r* ist bisher leider nichts bekannt. Die Erforschung dieser wäre daher ein interessanter Ansatz für weitere detaillierte Studien der Funktionsweise von Bittergeschmacksrezeptoren.

4.2.3.3 Zeitliche Regulation?

Auch eine zeitlich abgegrenzte Transkription verschiedener *Tas2r* innerhalb der Bitterzellen wäre denkbar. Offenbar beträgt die durchschnittliche Lebensdauer (Halbwertszeit) von Typ II-Zellen nur acht Tage (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013). Eine experimentell gestützte Annahme ist weiterhin, dass Typ II-Zellen, gleichwie Typ III-Zellen, zum selben Zeitpunkt aus undifferenzierten, sich in einem Ruhezustand befindlichen Zellen hervorgehen (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013). So liegt es nahe, dass die Ausbildung dieser Zellen über eine spezielle Signalgebung erfolgen könnte, die u. a. abhängig vom Alter der Geschmacksknospenzelle ist. Beispielweise könnten unterschiedliche Transkriptionsfaktoren dabei eine Rolle spielen. In derselben Weise bestünde die Möglichkeit, dass ein und dieselbe Bitterzelle zu einem früheren Zeitpunkt ein anderes Set an Bittergeschmacksrezeptoren exprimiert, als in einem vorgeschrittenen Lebensalter. Somit bestünde zwar zu einem bestimmten Zeitpunkt – wie in dieser Arbeit dargelegt – ein festes heterogenes *Tas2r*-Expressionsmuster innerhalb der Bitterzellen, welches diese in Subpopulationen unterteilt. Jedoch wäre die Identität der Bitterzellen hinsichtlich ihrer ausgeprägten *Tas2r* damit abhängig von deren Lebensalter. Ein geeignetes Experiment zur Untersuchung dieser Theorie würde ein Einbau von 5-Ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) in VP-Geschmacksknospenzellen (Perea-Martinez, Nagai *et al.* 2013) von *Tas2r131^{BLiG/BLiG}*-Mäusen darstellen. Somit könnte nicht nur das Alter der hrGFP exprimierenden Bitterzellen, sondern auch von α -Gustducin exprimierenden Zellen bestimmt und deren Anzahl ins Verhältnis gesetzt werden.

4.3 Bitter-Unterscheidungsvermögen von Mäusen

Die bisher diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit offenbaren eindeutig, dass in oralen Geschmacksknospen von Mäusen verschiedene, teils überlappende Subpopulationen Bittergeschmacksrezeptor exprimierender Zellen existieren. Diese unterschiedlichen Populationen bilden die Voraussetzung für eine mögliche Unterscheidung verschiedener Bitterstoffe.

Wie schon in Abschnitt 1.3 ab Seite 10 angeführt, sind nicht alle Bitterstoffe für den Organismus beim Verzehr schädlich, sondern sie können auch zum besseren Geschmack von Lebensmitteln beitragen oder sich sogar gesundheitsfördernd auswirken (Barratt-Fornell und Drewnowski 2002; Meyerhof 2005). So könnten die hier identifizierten Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen eine Rolle in der Unterscheidung von unbekömmlichen und bekömmlichen Bitterstoffen während ihrer Detektion spielen.

4.3.1 Bitter-Unterscheidung auf Geschmacksrezeptorzell-Ebene

Dass murine Bitterzellen vermutlich funktionell verschieden sind, konnte bereits anhand ihrer Calcium-Reaktionen auf die fünf verschiedenen Bitterstoffe Cycloheximid, Chininhydrochlorid, Denatoniumbenzoat, Phenylthiocarbamid (PTC) und Sucroseoctacetat (SOA) in Ratten demonstriert werden (Caicedo und Roper 2001). Vor allem Chininhydrochlorid und Denatoniumbenzoat scheinen unterschiedliche Bitterzelltypen zu stimulieren (siehe 1.3.5.2, Seite 19).

Die in der hier vorliegenden Arbeit durchgeführten *Calcium-Imaging*-Experimente in Tas2r131^{BLiG/BLiG}-Tieren (3.2.3, Abbildung 30, Seite 106) bestätigen eine divergierende bitterreaktive Funktionalität einzelner Geschmacksknospenzellen auch in Mäusen. Getestet wurden dafür die Reaktionen von VP-Einzelzellen auf die drei unterschiedlichen Bitterstoffe Denatoniumbenzoat (Den), 6-*n*-Propylthiouracil (PROP) und Papanin (Pap). Obwohl innerhalb dieser Experimente zugegebenermaßen recht wenige der hrGFP-Zellen überhaupt messbare Reaktionen zeigten (Abbildung 30), können daraus dennoch einzelne wichtige Befunde abgeleitet werden. [Als Ursache für diese Reaktionen wurden bereits die geringeren $\Delta F/F$ -Werte für hrGFP-positive Zellen vermutet, für welche wiederum das teils überlappende Emissionsspektrum der hrGFP-Eigenfluoreszenz mit der *Fura*-Fluoreszenz verantwortlich sein könnte (3.2.3).]

Insgesamt reagieren sowohl Tas2r131 exprimierende Bitterzellen, als auch Bitterzellen, die kein Tas2r131 aufweisen, auf Pap. Überdies existieren offensichtlich auch Bitterzellen, die kein Tas2r131 exprimieren und nicht auf Pap reagieren. Folglich scheinen die nicht Tas2r131 exprimierenden Bitterzellen heterogen reaktiv zu sein.

Andererseits konnten bisher keine Tas2r131-Zellen identifiziert werden, die mit PROP oder Den stimulierbar sind. Würde sich die generelle Nicht-Ansprache auf diese beiden, Stoffe innerhalb der Tas2r131 exprimierenden Zellen bestätigen, wäre dies ein klarer Beweis für die funktionelle Unterscheidbarkeit dieser Zellen zu anderen Bitterzellen.

4.3.2 Bitter-Unterscheidung auf höheren Ebenen und im Verhalten

Obwohl, wie bisher erörtert, offenbar in Mäusen, sowie wahrscheinlich auch in Ratten, Affen und Menschen auf Seiten ihrer Bittergeschmacksrezeptorzellen die Voraussetzung für eine Unterscheidung verschiedener Bitterstoffe besteht, konnte jedoch bislang bei Säugetieren kein eindeutig divergierendes Bittergeschmacks-Verhalten nachgewiesen werden (Spector und Kopka 2002; Mueller, Hoon *et al.* 2005).

Auf verschiedenen Ebenen der Bittergeschmacks-Verarbeitung allerdings scheinen ebenfalls heterogene, teils überlappende Neuronenpopulationen, die auf verschiedene Bitterstoffe ansprechen, zu existieren. Beispielsweise sind Einzel-Neuronen erster Ordnung (IX. Hirnnerv und CT) von Ratten in der Lage zwischen Bittersubstanzen zu unterscheiden (Dahl, Erickson *et al.* 1997). Und, obwohl in Ratten die Neuronenaktivität in Antwort auf bestimmte Bitter-Stimuli hoch korrelativ ist (Lemon und Smith 2005), existieren Nervenzellen im Hirnstamm (NTS und PBN) von Ratten und Mäusen, die heterogen auf verschiedene Bitter-Stimuli reagieren (Geran und Travers 2006; Geran und Travers 2009; Wilson, Boughter *et al.* 2012). Zusätzlich wurden jüngst durch einen Kollegen unserer Arbeitsgruppe im NTS von Mäusen heterogen durch drei Bitterstoffe (Cycloheximid [Cyx], Chininhydrochlorid [Qui] und Cucurbitacin I [Cuc]) aktivierte, jedoch teils überlappende Neuronenpopulationen bestätigt (Töle 2013).

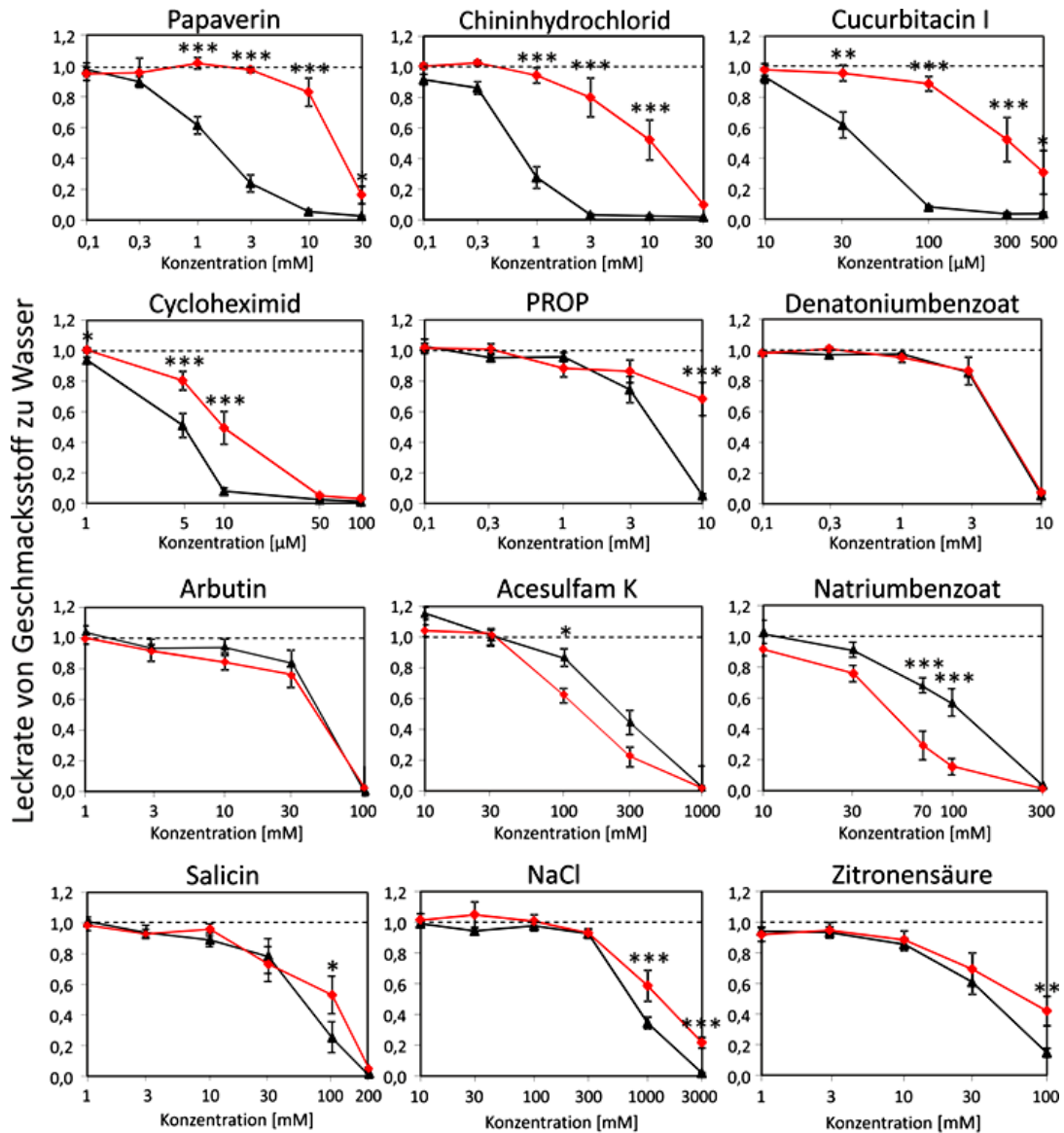
Somit bestünde auch seitens der Geschmacks-Verarbeitung, zumindest innerhalb der NTS-Neuronen, die Möglichkeit einer (teils limitierten) Bitter-Unterscheidung. Können sich nun aber die heterogenen Muster auf Ebenen der Bitter-Detektion und der Bittergeschmacks-Verarbeitung tatsächlich auch in einem divergierenden Verhalten gegenüber unterschiedlichen Bitterstoffen widerspiegeln?

4.3.2.1 Auswirkungen einer Tas2r131-Zellablation auf das Bittergeschmacksverhalten von Mäusen

Erste Antworten zum Bitter-Unterscheidungsvermögen können aus Verhaltensexperimenten mit Mäusen, in denen die Tas2r131-Zellen ablatiert sind, gezogen werden.

Innerhalb ihrer Doktorarbeit in der MOGE, etablierte Sabine Frenzel ein Protokoll zur Messung von Kurzzeit-Bittergeschmackspräferenzen mittels *Lickometer*. In Bezug auf die bisher in der vorliegenden Arbeit präsentierten Experimente, wurden auch die Bitter-Präferenzen von Mäusen des Tas2r131^{BLiC}/R26^{DTA}-Stammes im *Lickometer*-System gemessen. Die Idee dahinter war, dass, wenn sich die funktionellen Bittergeschmacksrezeptoren auf mehrere verschiedene Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulationen aufteilen, Tiere, in denen eine dieser Populationen (Tas2r131) vernichtet ist, ein unterschiedliches Geschmacks-Verhalten gegenüber verschiedenen Bitterstoffen haben müssten. Demnach erfolgten Messungen der Bittergeschmackspräferenzen von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}) im Vergleich zu Kontrolltieren. Diese Versuche wurden von Sabine Frenzel und Antje Stolzenburg in enger Absprache zu meinen Analysen und mit meiner theoretischen sowie auch praktischen Unterstützung geplant und durchgeführt. Eine finale Auswertung, Zusammenfassung und Darstellung der Ergebnisse erfolgten eigens (Abbildung 36).

4 Diskussion



Substanz	aktivierte/r Rezeptor/en
Papaverin	Tas2r144
Chininhydrochlorid	Tas2r115 Tas2r108 Tas2r140 Tas2r137 Tas2r126 Tas2r105 Tas2r144
Cucurbitacin I	Tas2r114 Tas2r105
Cycloheximid	Tas2r105
PROP	Tas2r121 Tas2r105 Tas2r135 Tas2r120 Tas2r108 Tas2r137
Denatoniumbenzoat	Tas2r105 Tas2r135 Tas2r123 Tas2r140 Tas2r144
Arbutin	Tas2r126
Acesulfam K	Tas2r135
Natriumbenzoat	Tas2r105 Tas2r135
Salicin	Tas2r126

Expression nach Tas2r131-Zell-ablation: >100% 100-40% 40-10% <10%

Abbildung 36: Im *Lickometer*-System gemessene Kurzzeit-Geschmackspräferenzen (Leckraten von Geschmacksstoff zu Wasser) von *Tas2r131^{BLIC}/R26^{DTA}*-Mäusen. Einige Bitterstoffe werden von *Tas2r131^{+/BLIC}/R26^{+/DTA}*-Mäusen (rote Kurven) im Vergleich zu Kontrolltieren (schwarze Kurven) unverändert vermieden, während die Aversion gegenüber anderen moderat bis stark reduziert ist. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zweifaktorieller ANOVA gefolgt von Kontrast-Tests mit *Bonferroni*-Korrektur, * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; n pro Gruppe = 8–20. Unten: Tabelle mit bisher bekannten durch die verwendeten Bittersubstanzen aktivierten Tas2r (Loßow 2011). Erstgenannte Tas2r werden durch Substanz am stärksten aktiviert, dann absteigend bis zum letztgenannten Tas2r, der durch die entsprechende Substanz am schwächsten aktiviert wird. Die Graustufen der Tas2r kennzeichnen die Expressionsstärke dieser nach *Tas2r131*-Zellablation und damit deren Vorkommen in anderen Zellpopulationen.

Die Analysen im *Lickometer*-System offenbaren, dass Mäuse mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation einige Bitterstoffe, wie Denatoniumbenzoat (Den), Arbutin (Arb) und Salicin (Sal) unverändert schmecken, weil sie diese genauso stark ablehnen, wie Kontrollmäuse (Ausnahme Sal – 100 mM, Abbildung 36). Acesulfam K (Ace) und Natriumbenzoat (NaBenz) werden von Tas2r131^{+BLiC}/R26^{+DTA}-Mäusen sogar noch etwas stärker gemieden, daher vermutlich stärker geschmeckt. Andere Bittersubstanzen, wie Papaverin (Pap), Chininhydrochlorid (Qui), Cucurbitacin I (Cuc), Cycloheximid (Cyx) oder 6-*n*-Propylthiouracil (PROP), werden von diesen Mäusen bereitwilliger aufgenommen und daher scheinbar nicht mehr so stark geschmeckt. Die Fähigkeit der Mäuse mit ablatierten Tas2r131-Zellen, Bitteres zu schmecken und darauf zu reagieren, bleibt also zu einem großen Teil erhalten, womit eine vollständige Ko-Expression der gustatorischen Tas2r auch auf Verhaltensebene ausgeschlossen werden kann.

Nach dem bisher bekannten Tas2r-Aktivierungsspektrum der verwendeten Bitterstoffe (Loßow 2011), kann geschlossen werden, dass Substanzen, die am stärksten bzw. ausschließlich Tas2r aktivieren, welche mit Tas2r131 ko-exprimiert sind, nach Tas2r131-Zellablation weniger geschmeckt werden. Das beste Beispiel dafür bildet Papaverin (Pap, Abbildung 36), das von den Mäusen mit Tas2r131-Zellablation bis zu einer Konzentration von rund 10 mM vergleichbar wie Wasser getrunken wird. Nach bisherigem Kenntnisstand aktiviert Pap ausschließlich den Bitterrezeptor Tas2r144 (Loßow 2011). Dieser wiederum ist in der Wallpapille vollständig mit Tas2r131 ko-exprimiert (4.2.1.3, Seite 128). Dass Pap von den Tas2r131^{+BLiC}/R26^{+DTA}-Mäusen in hohen Konzentrationen trotzdem noch geschmeckt wird, könnte z. B. auf dessen Expression in Pilzpapillen bzw. in Geschmacksknospen des Gaumens beruhen. Denn bisher ist nicht klar, ob dort, d. h. in den andersartigen Papillen-Typen, dasselbe Ko-Expressionsmuster vorherrscht, wie in VP und FoP. Oder es könnte eine schwache Aktivierung eines bisher noch unbekanntes Tas2r durch Pap dafür verantwortlich sein. Qui, Cuc, Cyx und PROP aktivieren mehrere (bzw. Cyx einen) Tas2r (Abbildung 36), welche in verschiedenen Ausmaßen zum Teil mit Tas2r131 ko-exprimiert sind (4.2.1.3). Daher ist es nicht verwunderlich, dass Mäuse mit ablatierten Tas2r131-Zellen diese Substanzen zwar nicht so stark ablehnen wie die Kontrolltiere, jedoch immer noch in der Lage sind, diese Bitterstoffe deutlich zu schmecken.

Andererseits scheinen Mäuse mit Tas2r131-Zellablation Bitterstoffe unverändert zu schmecken, wenn diese hauptsächlich bzw. ausschließlich von Rezeptoren detektiert werden, die vollständig oder größtenteils außerhalb der Tas2r131-Zellpopulation exprimiert werden. Die besten Beispiele hierfür bilden Arb und Sal (Abbildung 36), die jeweils ausschließlich von Tas2r126 erkannt werden (Loßow 2011). Dieser Rezeptor scheint komplett außerhalb der Tas2r131-Zellpopulation exprimiert zu sein (4.2.1.3). Den wird am potentesten von Tas2r105 und Tas2r135 erkannt (Loßow 2011). Somit scheinen diese beiden Tas2r, von denen Tas2r105 moderat und Tas2r135 größtenteils außerhalb der Tas2r131-Zellen exprimiert sind, hauptsächlich für das Schmecken von Den verantwortlich zu sein.

Dass es auch Bitterstoffe gibt, die von den Zell-ablatierten Mäusen sogar etwas intensiver geschmeckt werden, scheint erstaunlich. Ace und NaBenz werden jeweils von Tas2r135 bzw. Tas2r105 und Tas2r135 erkannt (Loßow 2011), Rezeptoren, die wie o. g. moderat bis größtenteils in anderen als den Tas2r131 exprimierenden Zellen vorkommen. Ob durch die fehlenden Tas2r131-Zellen eventuell letztlich z. B. mehr Tas2r135 exprimierende Zellen entstehen (als Kompensation), oder ob vielleicht Veränderungen in der Weiterleitung der von diesen Zellen ausgehenden Signale, beispielsweise durch veränderte Nervenbahnen, eine Rolle spielen, bleibt zu klären.

Auch NaCl und Zitronensäure werden von Tas2r131^{+/BLiC}/R26^{+/DTA}-Mäusen in hohen Konzentration etwas weniger vermieden, als von Kontrollmäusen. Es wurde bereits publiziert, dass der aversive Salzgeschmack (hohe Konzentrationen) teilweise über Bitterzellen vermittelt wird (Oka, Butnaru *et al.* 2013). Die Sensoren dafür blieben jedoch unbekannt. So besteht hier die Möglichkeit, dass Bitterrezeptoren für die Detektion der hoch konzentrierten Salze in den Bitterzellen verantwortlich sind.

4.3.2.2 Mögliche Kontroversen

Geht man von einer Vergleichbarkeit von Ratten und Mäusen bezüglich ihrer Bittergeschmackswahrnehmung aus, scheint es abermals diskussionswürdig, warum Ratten Qui und Den scheinbar nicht voneinander diskriminieren können (Spector und Kopka 2002). Denn in den gerade erläuterten Versuchen macht es den Eindruck, dass Qui und Den in Mäusen von unterschiedlichen Tas2r exprimierenden Zellsubpopulationen detektiert würden. Die Versuche von Spector und Kopka könnten also ein Beweis für die Nicht-Unterscheidbarkeit von dem einem und dem anderen Bitterstoff sein. Fraglich bleibt jedoch, ob das auch für alle anderen Bittersubstanzen gilt. Ausgerechnet diese beiden Stoffe aktivieren nämlich mehrere verschiedene Maus-Tas2r (Qui: 7 Tas2r, Den: 5 Tas2r, siehe Abbildung 36) und haben dabei Tas2r105 und Tas2r144 gemeinsam. Außerdem konnte bereits bei Ratten in Einzel-Neuronenableitungen von Geschmacksneuronen erster Ordnung eine hohe Ähnlichkeit zwischen Den- und Qui-Reaktionen gezeigt werden, während andere Bitter-Stimuli hingegen heterogenere Reaktionen hervorriefen (Dahl, Erickson *et al.* 1997). Diese beiden Bitterstoffe scheinen also nicht die geeignetsten Kandidaten, um die Fähigkeit bitter zu unterscheiden final auszuschließen. Vielmehr könnten sie als Beispiel für eine weitere Theorie dienen: Die Fähigkeit verschiedener Tas2r ein und denselben Bitterstoff zu erkennen und darüber hinaus die Aufteilung der Tas2r auf verschiedene Zellen, könnten zur Sicherstellung der Detektion von giftigen Stoffen dienen. Somit würde einerseits einer möglichen Desensibilisierung und zweitens einer möglichen Konkurrenz zwischen Tas2r entgegengewirkt. Auch dass in höheren Konzentrationen jede in unseren Experimenten verwendete Bittersubstanz letztlich ein aversives Verhalten auszulösen scheint, könnte auf die Aufteilung der Bittergeschmacksrezeptoren auf verschiedene Zellpopulationen zum Sicherstellen der Erkennung von giftigen Stoffen in der Nahrung hindeuten.

Gesondert sprachen Experimente in *Plcβ2-Knock-out*-Mäusen gegen eine Unterscheidbarkeit verschiedener Bitterstoffe (Mueller, Hoon *et al.* 2005). Durch selektive Wiedereinführung von *Tas2r*-Promotor-Regionen in die *Plcβ2-Knock-outs*, konnte die Fähigkeit dieser Mäuse, verschiedenste Bitterstoffe zu schmecken, wiederhergestellt werden (Mueller, Hoon *et al.* 2005). Die Ursache dafür könnte allerdings in der Auswahl der *Tas2r*-Promotoren (*Tas2r105* und *Tas2r139*) für diese Versuche liegen, mit welcher wahrscheinlich ein sehr breites Repertoire an Bittergeschmacksrezeptorzellen wiederhergestellt wurde. (1) Gerade *Tas2r105* und *Tas2r139* sind zwei in VP+FoP sehr stark exprimierte Bitterrezeptoren, stärker als *Tas2r131* (Tabelle 41, Seite 124), kommen also wahrscheinlich in wesentlich mehr als 62% der Bitterzellen vor. In einer ihrer späteren Publikationen zeigen dieselben Autoren sogar in genetisch veränderten Mäusen, dass *Tas2r139* in scheinbar 75% der Bitterzellen exprimiert ist (Oka, Butnaru *et al.* 2013). Also ist von einer Ko-Expression zahlreicher anderer *Tas2r* in den funktionell wiederhergestellten Bitterzellen der untersuchten Mäuse (Mueller, Hoon *et al.* 2005) auszugehen und daher die Fähigkeit des Schmeckens vieler diverser Bitterstoffe nicht verwunderlich. (2) Da über die transkriptionelle Regulation und die Promotoren der *Tas2r* noch wenig bekannt ist, könnte es sein, dass eine Promotor-Region die Expression vieler verschiedener *Tas2r* reguliert. Damit wäre, bei der Wiedereinführung einer solchen, die Wiederherstellung von *Plcβ2* in vielen verschiedenen Zellen möglich. Gerade *Tas2r105* liegt in einem engen chromosomalen Gen-Cluster (Abbildung 4, Seite 15). Somit bleibt auch für diese Experimente weiterhin fraglich, ob sie tatsächlich als eindeutiger Beweis gegen die Fähigkeit Bitterstoffe unterscheiden zu können geeignet sind.

4.3.2.3 Ansätze zur Verschlüsselung der Bitter-Geschmacksinformationen

Bisher ist noch nicht geklärt, wie Geschmacksinformationen verschiedener Qualitäten verschlüsselt und weitergeleitet werden. Insofern ist es auch ungewiss, ob ein bestimmtes Bitter-Aktivierungsmuster, welches durch die Anregung von Subpopulationen der Bittergeschmacksrezeptorzellen hervorgerufen werden könnte, auch tatsächlich zunächst über die Geschmacksneuronen erster Ordnung aufrecht erhalten würde. Dorthin spielt wiederum die Frage nach der Verschlüsselung der Geschmacksinformationen. So könnten weiterhin die Theorien der Kodierung in „markierten Bahnen“ (*labeled line*-Theorie (Frank 1973; Pfaffmann 1974)) oder in festen „Mustern“ über die Gesamtheit der Nervenfasern (*across fibre pattern*-Theorie (Pfaffmann 1941)) Bestand haben. Auch die zeitlich regulierte Aktivierung verschiedener Geschmacksnerven (Chaudhari und Roper 2010) bliebe diskutabel. Anhand der bislang darlegten *Tas2r*-Expressionsmuster in Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen und der Aktivierungsmuster von NTS-Neuronen in Reaktion auf Bitter-Stimuli, scheint jedoch eine Übertragung von Bitter-Geschmacksinformationen in „Mustern“, eventuell kombiniert mit einer zeitlichen Regulation, plausibel.

Zum Beispiel, weil Mäuse mit ablatierten *Tas2r131*-Zellen einige Bitterstoffe mehr vermeiden, spräche dies für eine Bitter-Signalübertragung in „Mustern“; ausgehend von einem somit größeren prozentualen Anteil an übrigen Geschmacksknospenzellen, die

den oder die entsprechenden Tas2r exprimieren. Auch die diversen, unzähligen und wahrscheinlich komplexen Subpopulationen von Tas2r exprimierenden Zellen sprächen – im Falle, dass sie wirklich der Wahrnehmung unterschiedlicher Stimuli dienen – für eine Muster-Übertragung. Denn laut bisherigem Kenntnisstand, z. B. weil individuelle Geschmacksknospen der Pilzpapillen lediglich von drei bis fünf, bzw. des Gaumens von fünf bis acht Nervenfasern innerviert werden (Zaidi und Whitehead 2006), scheint es eher unwahrscheinlich, dass angemessen viele Geschmacksnervenfasern erster Ordnung existieren, die in der Lage wären, alle verschiedenen Bitter-Stimuli separiert zu übertragen.

4.3.3 Konsequenzen

Insgesamt sprechen die wiederkehrenden Expressionsmuster der Tas2r innerhalb der Geschmacksrezeptorzellen, die heterogen durch Bitter-Stimuli aktivierten Nervenzellen und die Variabilität in der Geschmacksverhaltensantwort von genetisch modifizierten Mäusen für eine heterogene Bittergeschmacksdetektion und -wahrnehmung. Welche Hintergründe diese heterogene Bittergeschmackswahrnehmung hat, bleibt noch vollständig aufzuklären.

Sie könnte, wie bereits erwähnt, generell die Detektion aller Bitterstoffe sicherstellen, einer Desensibilisierung entgegenwirken, oder mögliche Konkurrenz zwischen Tas2r abwenden.

Sie könnte aber auch die Grundlage für ein divergierendes Verhalten gegenüber unterschiedlichen Bitterstoffen darstellen, um z. B. unverträgliche und harmlose oder gar nützliche Bittersubstanzen auseinanderzuhalten, oder gesunde von ungesunder Nahrung anhand der enthaltenen Bitterstoffe zu unterscheiden. Da die in dieser Arbeit aufgezeigten Expressionsmuster der Tas2r jedoch sehr komplex sind, sowie die Geschmacks-Signalübertragung noch nicht aufgeklärt ist, bleibt diese Theorie experimentell schwierig zu bestätigen. Um sie unumstößlich zu beweisen, müssten optimalerweise zunächst zwei Bitterstoffe identifiziert werden, die beide möglichst jeweils nur einen Tas2r aktivieren. Und die jeweiligen Tas2r müssten überdies noch in unterschiedlichen Bittergeschmacksrezeptor-Zellpopulationen zu finden sein. Diese beiden Bitterstoffe wären dann der ideale Ausgangspunkt für Verhaltenstests zu deren Unterscheidbarkeit. Darin könnten Mäuse durch Belohnung konditioniert werden, einen bestimmten Bitterstoff an einer definierten Stelle zu empfangen, einen weiteren an einer anderen Stelle. Wäre es dann den Mäusen möglich, nach zufälliger Gabe der beiden Bitterstoffe, den jeweils dafür definierten Ort aufzusuchen, wäre dies ein Beweis, dass sie die beiden Substanzen auseinanderhalten können.

Allgemein kann in Säugern beobachtet werden, dass das *Tas2r*-Repertoire scheinbar ständig funktionell an deren Nahrungsspektrum angepasst wird (Hu und Shi 2013; Li und Zhang 2013). So könnte die Gruppierung der Tas2r in unterschiedlichen Bittergeschmacksrezeptor-Zellsubpopulationen ebenso evolutionäre Ursachen haben. So wäre es beispielsweise denkbar, dass ein Tas2r, in Anpassung an einen nützlichen, jedoch in geringen Konzentrationen nicht giftigen Bitterstoff, in weniger Bitterzellen

exprimiert wird, um diesen Stoff in niedrigen Konzentrationen in der Nahrung zu akzeptieren. Äußerst toxische Stoffe hingegen würden vielleicht von Rezeptoren erkannt, die in vielen der Bitterzellen vorkommen. Da allerdings die Möglichkeit besteht, dass ein Bitterstoff von mehreren Tas2r detektiert wird, bleibt auch diese Theorie schwierig zu bestätigen, und bisher konnte dazu keine Korrelation hergestellt werden. Dass außerdem die Giftigkeit eines Stoffes immer von dessen Konzentration abhängt und speziesspezifisch ist, macht ein Auffinden solcher Verknüpfungen noch unübersichtlicher.

Insgesamt stellt sich die Bittergeschmackswahrnehmung in Säugetieren abermals als ein hochkomplexes Phänomen heraus, welches durch die hier neu aufgezeigten heterogenen Expressions- und Verhaltensmuster in Mäusen an Vielschichtigkeit weiter zunimmt. Die scheinbar fortwährende evolutionäre Anpassung der Bitterrezeptor-Gene weist dabei auf die Bedeutsamkeit der Bittergeschmackswahrnehmung hin.

5 Zusammenfassung

Der Bittergeschmack dient Säugern vermutlich zur Wahrnehmung und Vermeidung toxischer Substanzen. Bitterstoffe können jedoch auch gesund sein oder werden oft bereitwillig mit der Nahrung aufgenommen. Ob sie geschmacklich unterschieden werden können, ist allerdings umstritten. Detektiert werden Bitterstoffe von oralen Bittergeschmacksrezeptoren, den TAS2R (human) bzw. Tas2r (murin). In der Literatur gibt es aber immer mehr Hinweise darauf, dass überdies Tas2r nicht nur in extragustatorischen Organen exprimiert werden, sondern dort auch wichtige Aufgaben erfüllen könnten, was wiederum die Aufklärung ihrer noch nicht vollständig entschlüsselten Funktionsweisen erfordert. So ist noch unbekannt, ob alle bisher als funktionell identifizierten Tas2r wirklich gustatorische Funktionen erfüllen.

Im Rahmen der Charakterisierung neu generierter, im Locus des Bittergeschmacksrezeptors Tas2r131 genetisch modifizierter Mauslinien, wurde in vorliegender Arbeit die gustatorische sowie extragustatorische Expression von Tas2r131 untersucht. Dass Tas2r131 nicht nur in Pilzpapillen, Wall- und Blätterpapillen (VP+FoP), Gaumen, NID, Vomeronasalorgan und Kehldeckel, sondern auch in Thymus, Testes und Nebenhodenkopf, in Gehirnarealen sowie im *Ganglion geniculatum* nachgewiesen wurde, bildete die Grundlage für weiterführende Studien. Die vorliegende Arbeit zeigt außerdem, dass Tas2r108, Tas2r126, Tas2r135, Tas2r137 und Tas2r143 in Blut exprimiert werden, was auf eine heterogene Funktion der Tas2r hindeutet. Dass zusätzlich erstmals Expression aller 35 als funktionell beschriebenen Tas2r im gustatorischen VP+FoP-Epithel von C57BL/6-Mäusen nachgewiesen wurde, verweist auf deren Relevanz als funktionelle Geschmacksrezeptoren.

Weiter zeigten Untersuchungen zur Aufklärung eines möglichen Bitter-Unterscheidungsvermögens in Geschmackspapillen von Mäusen mit fluoreszenzmarkierten oder ablatierten Tas2r131-Zellen, dass Tas2r131 exprimierende Zellen eine Tas2r-Zellsubpopulation bilden. Darüber hinaus existieren innerhalb der Bitterzellen geordnete Tas2r-Expressionsmuster, die sich nach der chromosomalen Lage ihrer Gene richten. Isolierte Bitterzellen reagieren heterogen auf bekannte Bitterstoffe. Und Mäuse mit ablatierter Tas2r131-Zellpopulation besitzen noch andere Tas2r-Zellen und schmecken damit einige Bitterstoffe kaum noch, andere aber noch sehr gut. Diese Befunde belegen die Existenz verschiedener gustatorischer Tas2r-Zellpopulationen, welche die Voraussetzung bilden, Bitterstoffe heterogen zu detektieren. Ob dies die Grundlage für ein divergierendes Verhalten gegenüber unverträglichen und harmlosen oder gar nützlichen Bitterstoffen darstellt, kann mit Hilfe der dargelegten Tas2r-Expressionsmuster künftig in Verhaltensexperimenten geprüft werden.

Die Bittergeschmackswahrnehmung in Säugetieren stellt sich als ein hochkomplexer Mechanismus dar, dessen Vielschichtigkeit durch die hier neu aufgezeigten heterogenen Tas2r-Expressions- und Funktionsmuster erneut verdeutlicht wird.

6 Literaturverzeichnis

- Achan, J., A. O. Talisuna, A. Erhart, A. Yeka, J. K. Tibenderana, F. N. Baliraine, P. J. Rosenthal und U. D'Alessandro (2011). *Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria*. MALAR J **10**: 144.
- Adler, E., M. A. Hoon, K. L. Mueller, J. Chandrashekar, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2000). *A novel family of mammalian taste receptors*. CELL **100**(6): 693-702.
- Andres-Barquin, P. J. und C. Conte (2004). *Molecular basis of bitter taste: the T2R family of G protein-coupled receptors*. CELL BIOCHEM BIOPHYS **41**(1): 99-112.
- Arvidson, K. (1979). *Location and variation in number of taste buds in human fungiform papillae*. SCAND J DENT RES **87**(6): 435-442.
- Bachmanov, A. A., D. R. Reed, X. Li und G. K. Beauchamp (2002). *Genetics of sweet taste preferences*. PURE APPL CHEM **74**(7): 1135-1140.
- Bagus, T. (2011). *Zellkommunikation in Geschmacksknospen des Gaumens - Verteilung eines transneuronalen Markers im Mausmodell*. Masterarbeit, Universität Potsdam.
- Barratt-Fornell, A. und A. Drewnowski (2002). *The Taste of Health: Nature's Bitter Gifts*. NUTR TODAY **37**(4): 144-150.
- Barry, M. A. (1992). *Ecto-calcium-dependent ATPase activity of mammalian taste bud cells*. J HISTOCHEM CYTOCHEM **40**(12): 1919-1928.
- Bartel, D. L., S. L. Sullivan, E. G. Lavoie, J. Sevigny und T. E. Finger (2006). *Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds*. J COMP NEUROL **497**(1): 1-12.
- Behnke, U. und E. Schalinatus (1975). *Zur Entstehung bitterer Peptide in Käse und aus Casein*. FOOD / NAHRUNG **19**(9-10): 839-843.
- Behrens, M., A. Brockhoff, C. Kuhn, B. Bufe, M. Winnig und W. Meyerhof (2004). *The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN **319**(2): 479-485.
- Behrens, M., S. Foerster, F. Staehler, J. D. Raguse und W. Meyerhof (2007). *Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells*. J NEUROSCI **27**(46): 12630-12640.
- Behrens, M. und W. Meyerhof (2011). *Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors*. PHYSIOL BEHAV **105**(1): 4-13.
- Behrens, M. und W. Meyerhof (2013). *Bitter taste receptor research comes of age: from characterization to modulation of TAS2Rs*. SEMIN CELL DEV BIOL **24**(3): 215-221.
- Behrens, M., A. Voigt und W. Meyerhof (2013). *Geschmack und Ernährung: 1. Die physiologischen Grundlagen der Geschmackswahrnehmung*. ERNÄHRUNGS UMSCHAU **07/13** (60(7)): Seite 124 bis 131.

- Beidler, L. M. und R. L. Smallman (1965). *Renewal of cells within taste buds*. J CELL BIOL **27**(2): 263-272.
- Biarnes, X., A. Marchiori, A. Giorgetti, C. Lanzara, P. Gasparini, P. Carloni, S. Born, A. Brockhoff, M. Behrens und W. Meyerhof (2010). *Insights into the binding of Phenylthiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor*. PLOS ONE **5**(8): e12394.
- Born, S., A. Levit, M. Y. Niv, W. Meyerhof und M. Behrens (2013). *The human bitter taste receptor TAS2R10 is tailored to accommodate numerous diverse ligands*. J NEUROSCI **33**(1): 201-213.
- Brockhoff, A., M. Behrens, A. Massarotti, G. Appendino und W. Meyerhof (2007). *Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium*. J AGRIC FOOD CHEM **55**(15): 6236-6243.
- Brockhoff, A., M. Behrens, M. Y. Niv und W. Meyerhof (2010). *Structural requirements of bitter taste receptor activation*. PROC NATL ACAD SCI U S A **107**(24): 11110-11115.
- Brockhoff, A., M. Behrens, N. Roudnitzky, G. Appendino, C. Avonto und W. Meyerhof (2011). *Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds*. J NEUROSCI **31**(41): 14775-14782.
- Brockschneider, D., Y. Pechmann, E. Sonnenberg-Riethmacher und D. Riethmacher (2006). *An improved mouse line for Cre-induced cell ablation due to diphtheria toxin A, expressed from the Rosa26 locus*. GENESIS **44**(7): 322-327.
- Bromke, M. (2013). *On the localization and physiological function of bitter taste receptors in the gastrointestinal tract*. Dissertation, Universität Potsdam.
- Bufe, B., P. A. Breslin, C. Kuhn, D. R. Reed, C. D. Tharp, J. P. Slack, U. K. Kim, D. Drayna und W. Meyerhof (2005). *The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception*. CURR BIOL **15**(4): 322-327.
- Bufe, B., T. Hofmann, D. Krautwurst, J. D. Raguse und W. Meyerhof (2002). *The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucoopyranosides*. NAT GENET **32**(3): 397-401.
- Caicedo, A. und S. D. Roper (2001). *Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli*. SCIENCE **291**(5508): 1557-1560.
- Capeless, C. G., G. Whitney und E. A. Azen (1992). *Chromosome mapping of Soa, a gene influencing gustatory sensitivity to sucrose octaacetate in mice*. BEHAV GENET **22**(6): 655-663.
- Cartoni, C., K. Yasumatsu, T. Ohkuri, N. Shigemura, R. Yoshida, N. Godinot, J. le Coutre, Y. Ninomiya und S. Damak (2010). *Taste preference for fatty acids is mediated by GPR40 and GPR120*. J NEUROSCI **30**(25): 8376-8382.
- Chandrashekar, J., M. A. Hoon, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2006). *The receptors and cells for mammalian taste*. NATURE **444**(7117): 288-294.

- Chandrashekar, J., C. Kuhn, Y. Oka, D. A. Yarmolinsky, E. Hummler, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2010). *The cells and peripheral representation of sodium taste in mice*. NATURE **464**(7286): 297-301.
- Chandrashekar, J., K. L. Mueller, M. A. Hoon, E. Adler, L. Feng, W. Guo, C. S. Zuker und N. J. Ryba (2000). *T2Rs function as bitter taste receptors*. CELL **100**(6): 703-711.
- Chandrashekar, J., D. Yarmolinsky, L. von Buchholtz, Y. Oka, W. Sly, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2009). *The taste of carbonation*. SCIENCE **326**(5951): 443-445.
- Chaudhari, N., A. M. Landin und S. D. Roper (2000). *A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor*. NAT NEUROSCI **3**(2): 113-119.
- Chaudhari, N., E. Pereira und S. D. Roper (2009). *Taste receptors for umami: the case for multiple receptors*. AM J CLIN NUTR **90**(3): 738S-742S.
- Chaudhari, N. und S. D. Roper (2010). *The cell biology of taste*. J CELL BIOL **190**(3): 285-296.
- Chen, M. C., S. V. Wu, J. R. Reeve, Jr. und E. Rozengurt (2006). *Bitter stimuli induce Ca²⁺ signaling and CCK release in enteroendocrine STC-1 cells: role of L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channels*. AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL **291**(4): C726-739.
- Chen, X., M. Gabitto, Y. Peng, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2011). *A gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain*. SCIENCE **333**(6047): 1262-1266.
- Cheng, L. H. und P. P. Robinson (1991). *The distribution of fungiform papillae and taste buds on the human tongue*. ARCH ORAL BIOL **36**(8): 583-589.
- Clapp, T. R., L. M. Stone, R. F. Margolskee und S. C. Kinnamon (2001). *Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP₃ receptor with signaling components of bitter taste transduction*. BMC NEUROSCI **2**: 6.
- Conte, C., M. Ebeling, A. Marcuz, P. Nef und P. J. Andres-Barquin (2003). *Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human*. PHYSIOL GENOMICS **14**(1): 73-82.
- Dahl, M., R. P. Erickson und S. A. Simon (1997). *Neural responses to bitter compounds in rats*. BRAIN RES **756**(1-2): 22-34.
- Damak, S., M. Rong, K. Yasumatsu, Z. Kokrashvili, V. Varadarajan, S. Zou, P. Jiang, Y. Ninomiya und R. F. Margolskee (2003). *Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3*. SCIENCE **301**(5634): 850-853.
- Danilova, V., S. Damak, R. F. Margolskee und G. Hellekant (2006). *Taste responses to sweet stimuli in alpha-gustducin knockout and wild-type mice*. CHEM SENSES **31**(6): 573-580.
- DeFazio, R. A., G. Dvoryanchikov, Y. Maruyama, J. W. Kim, E. Pereira, S. D. Roper und N. Chaudhari (2006). *Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds*. J NEUROSCI **26**(15): 3971-3980.
- Dehkordi, O., J. E. Rose, M. Fatemi, J. S. Allard, K. V. Balan, J. K. Young, S. Fatima, R. M. Millis und A. Jayam-Trouth (2012). *Neuronal expression of bitter taste receptors and downstream signaling molecules in the rat brainstem*. BRAIN RES **1475**: 1-10.

- Delwiche, J. F., Z. Buletic und P. A. Breslin (2001). *Covariation in individuals' sensitivities to bitter compounds: evidence supporting multiple receptor/transduction mechanisms*. PERCEPT PSYCHOPHYS **63**(5): 761-776.
- Deshpande, D. A., W. C. Wang, E. L. McIlmoyle, K. S. Robinett, R. M. Schillinger, S. S. An, J. S. Sham und S. B. Liggett (2010). *Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction*. NAT MED **16**(11): 1299-1304.
- Döring, L. (2012). *Expressionsanalysen des Bitterrezeptors Tas2r131 während der Entwicklung der Maus*. Masterarbeit, Universität Potsdam.
- Dotson, C. D., L. Zhang, H. Xu, Y. K. Shin, S. Vignes, S. H. Ott, A. E. Elson, H. J. Choi, H. Shaw, J. M. Egan, *et al.* (2008). *Bitter taste receptors influence glucose homeostasis*. PLOS ONE **3**(12): e3974.
- Dvoryanchikov, G., Y. A. Huang, R. Barro-Soria, N. Chaudhari und S. D. Roper (2011). *GABA, its receptors, and GABAergic inhibition in mouse taste buds*. J NEUROSCI **31**(15): 5782-5791.
- El-Tawil, S., T. Al Musa, H. Valli, M. P. Lunn, T. El-Tawil und M. Weber (2010). *Quinine for muscle cramps*. COCHRANE DATABASE SYST REV(12): CD005044.
- Fehr, J., D. Meyer, P. Widmayer, H. C. Borth, F. Ackermann, B. Wilhelm, T. Gudermann und I. Boekhoff (2007). *Expression of the G-protein alpha-subunit gustducin in mammalian spermatozoa*. J COMP PHYSIOL A NEUROETHOL SENS NEURAL BEHAV PHYSIOL **193**(1): 21-34.
- Finger, T. E., B. Bottger, A. Hansen, K. T. Anderson, H. Alimohammadi und W. L. Silver (2003). *Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration*. PROC NATL ACAD SCI U S A **100**(15): 8981-8986.
- Finger, T. E., V. Danilova, J. Barrows, D. L. Bartel, A. J. Vigers, L. Stone, G. Hellekant und S. C. Kinnamon (2005). *ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves*. SCIENCE **310**(5753): 1495-1499.
- Fischer, A., Y. Gilad, O. Man und S. Paabo (2005). *Evolution of bitter taste receptors in humans and apes*. MOL BIOL EVOL **22**(3): 432-436.
- Foster, S. R., E. R. Porrello, B. Purdue, H. W. Chan, A. Voigt, S. Frenzel, R. D. Hannan, K. M. Moritz, D. G. Simmons, P. Molenaar, *et al.* (2013). *Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart*. PLOS ONE **8**(5): e64579.
- Frank, M. (1973). *An analysis of hamster afferent taste nerve response functions*. J GEN PHYSIOL **61**(5): 588-618.
- Frank, M. E., B. P. Bouverat, B. I. MacKinnon und T. P. Hettlinger (2004). *The distinctiveness of ionic and nonionic bitter stimuli*. PHYSIOL BEHAV **80**(4): 421-431.
- Fredriksson, R., M. C. Lagerstrom, L. G. Lundin und H. B. Schiöth (2003). *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. MOL PHARMACOL **63**(6): 1256-1272.

- Freydank, J. (2012). *Expressionsmuster von Bitterrezeptoren in Wallpapillen der Maus*. Bachelorarbeit, Hochschule Anhalt (FH) Bernburg.
- Friedrich, G. und P. Soriano (1991). *Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice*. GENES DEV **5**(9): 1513-1523.
- Galindo, M. M., N. Voigt, J. Stein, J. van Lengerich, J. D. Raguse, T. Hofmann, W. Meyerhof und M. Behrens (2012). *G protein-coupled receptors in human fat taste perception*. CHEM SENSES **37**(2): 123-139.
- Gao, N., M. Lu, F. Echeverri, B. Laita, D. Kalabat, M. E. Williams, P. Hevezi, A. Zlotnik und B. D. Moyer (2009). *Voltage-gated sodium channels in taste bud cells*. BMC NEUROSCI **10**: 20.
- Geran, L. C. und S. P. Travers (2006). *Single neurons in the nucleus of the solitary tract respond selectively to bitter taste stimuli*. J NEUROPHYSIOL **96**(5): 2513-2527.
- Geran, L. C. und S. P. Travers (2009). *Bitter-responsive gustatory neurons in the rat parabrachial nucleus*. J NEUROPHYSIOL **101**(3): 1598-1612.
- Glendinning, J. I., Y. M. Yiin, K. Ackroff und A. Sclafani (2008). *Intragastric infusion of denatonium conditions flavor aversions and delays gastric emptying in rodents*. PHYSIOL BEHAV **93**(4-5): 757-765.
- Go, Y., Y. Satta, O. Takenaka und N. Takahata (2005). *Lineage-specific loss of function of bitter taste receptor genes in humans and nonhuman primates*. GENETICS **170**(1): 313-326.
- Grassin-Delyle, S., C. Abrial, S. Fayad-Kobeissi, M. Brollo, C. Faisy, J. C. Alvarez, E. Naline und P. Devillier (2013). *The expression and relaxant effect of bitter taste receptors in human bronchi*. RESPIR RES **14**: 134.
- Green, B. G. (2012). *Chemesthesis and the chemical senses as components of a "chemofensor complex"*. CHEM SENSES **37**(3): 201-206.
- Grill, H. J. und R. Norgren (1978). *The taste reactivity test. II. Mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats*. BRAIN RES **143**: 281-297.
- Grollman, A. P., S. Shibutani, M. Moriya, F. Miller, L. Wu, U. Moll, N. Suzuki, A. Fernandes, T. Rosenquist, Z. Medverec, et al. (2007). *Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy*. PROC NATL ACAD SCI U S A **104**(29): 12129-12134.
- Gulbransen, B. D., T. R. Clapp, T. E. Finger und S. C. Kinnamon (2008). *Nasal solitary chemoreceptor cell responses to bitter and trigeminal stimulants in vitro*. J NEUROPHYSIOL **99**(6): 2929-2937.
- Hettinger, T. P., B. K. Formaker und M. E. Frank (2007). *Cycloheximide: no ordinary bitter stimulus*. BEHAV BRAIN RES **180**(1): 4-17.
- Hofmann, T., V. Chubanov, T. Gudermann und C. Montell (2003). *TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel*. CURR BIOL **13**(13): 1153-1158.

- Hoon, M. A., E. Adler, J. Lindemeier, J. F. Battey, N. J. Ryba und C. S. Zuker (1999). *Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity*. CELL **96**(4): 541-551.
- Hu, L. L. und P. Shi (2013). *[Smallest bitter taste receptor (T2Rs) gene repertoire in carnivores]*. DONGWUXUE YANJIU **34**(3): E75-81.
- Huang, A. L., X. Chen, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, W. Guo, D. Trankner, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2006). *The cells and logic for mammalian sour taste detection*. NATURE **442**(7105): 934-938.
- Huang, L., Y. G. Shanker, J. Dubauskaite, J. Z. Zheng, W. Yan, S. Rosenzweig, A. I. Spielman, M. Max und R. F. Margolskee (1999). *Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium*. NAT NEUROSCI **2**(12): 1055-1062.
- Huang, Y. A., R. Dando und S. D. Roper (2009). *Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds*. J NEUROSCI **29**(44): 13909-13918.
- Huang, Y. A., J. Grant und S. Roper (2012). *Glutamate may be an efferent transmitter that elicits inhibition in mouse taste buds*. PLOS ONE **7**(1): e30662.
- Huang, Y. A., Y. Maruyama und S. D. Roper (2008). *Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds*. J NEUROSCI **28**(49): 13088-13093.
- Huang, Y. A., Y. Maruyama, R. Stimac und S. D. Roper (2008). *Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste*. J PHYSIOL **586**(Pt 12): 2903-2912.
- Huang, Y. J., Y. Maruyama, G. Dvoryanchikov, E. Pereira, N. Chaudhari und S. D. Roper (2007). *The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds*. PROC NATL ACAD SCI U S A **104**(15): 6436-6441.
- Huffman, M. A. (2003). *Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants*. PROC NUTR SOC **62**(2): 371-381.
- Intelmann, D., C. Batram, C. Kuhn, G. Haseleu, W. Meyerhof und T. Hofmann (2009). *Three TAS2R Bitter Taste Receptors Mediate the Psychophysical Responses to Bitter Compounds of Hops (*Humulus lupulus* L.) and Beer*. CHEMOSENSORY PERCEPTION **2**(3): 118-132.
- Ishimaru, Y., M. Abe, T. Asakura, H. Imai und K. Abe (2012). *Expression analysis of taste signal transduction molecules in the fungiform and circumvallate papillae of the rhesus macaque, *Macaca mulatta**. PLOS ONE **7**(9): e45426.
- James, A., K. Daham, B. Dahlén, G. Hedlin, J. Kere, J. Konradsen, B. Nordlund, A. Lindeberg, E. Melen, C. Orsmark-Pietras, et al. (2012). *Expression Of Bitter Taste Receptors On Peripheral Blood Leukocytes From Asthmatic Patients*. A110. EMERGING INSIGHTS INTO OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE: LATE BREAKING ABSTRACTS, American Thoracic Society: A6752-A6752.
- Janssen, S., J. Laermans, P. J. Verhulst, T. Thijs, J. Tack und I. Depoortere (2011). *Bitter taste receptors and alpha-gustducin regulate the secretion of ghrelin with*

- functional effects on food intake and gastric emptying.* PROC NATL ACAD SCI U S A **108**(5): 2094-2099.
- Jeon, T. I., B. Zhu, J. L. Larson und T. F. Osborne (2008). *SREBP-2 regulates gut peptide secretion through intestinal bitter taste receptor signaling in mice.* J CLIN INVEST **118**(11): 3693-3700.
- Jiang, P., J. Josue, X. Li, D. Glaser, W. Li, J. G. Brand, R. F. Margolskee, D. R. Reed und G. K. Beauchamp (2012). *Major taste loss in carnivorous mammals.* PROC NATL ACAD SCI U S A **109**(13): 4956-4961.
- Jung, H. S., K. Akita und J. Y. Kim (2004). *Spacing patterns on tongue surface-gustatory papilla.* INT J DEV BIOL **48**(2-3): 157-161.
- Kaji, I., S. Karaki, Y. Fukami, M. Terasaki und A. Kuwahara (2009). *Secretory effects of a luminal bitter tastant and expressions of bitter taste receptors, T2Rs, in the human and rat large intestine.* AM J PHYSIOL GASTROINTEST LIVER PHYSIOL **296**(5): G971-981.
- Kataoka, S., R. Yang, Y. Ishimaru, H. Matsunami, J. Seigny, J. C. Kinnamon und T. E. Finger (2008). *The candidate sour taste receptor, PKD2L1, is expressed by type III taste cells in the mouse.* CHEM SENSES **33**(3): 243-254.
- Kim, M. R., Y. Kusakabe, H. Miura, Y. Shindo, Y. Ninomiya und A. Hino (2003). *Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue.* BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN **312**(2): 500-506.
- Kim, U., S. Wooding, D. Ricci, L. B. Jorde und D. Drayna (2005). *Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci.* HUM MUTAT **26**(3): 199-204.
- Kim, U. K., E. Jorgenson, H. Coon, M. Leppert, N. Risch und D. Drayna (2003). *Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide.* SCIENCE **299**(5610): 1221-1225.
- Kuhn, C., B. Bufe, C. Batram und W. Meyerhof (2010). *Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors.* CHEM SENSES **35**(5): 395-406.
- Kuhn, C., B. Bufe, M. Winnig, T. Hofmann, O. Frank, M. Behrens, T. Lewtschenko, J. P. Slack, C. D. Ward und W. Meyerhof (2004). *Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K.* J NEUROSCI **24**(45): 10260-10265.
- Lawton, D. M., D. N. Furness, B. Lindemann und C. M. Hackney (2000). *Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds.* EUR J NEUROSCI **12**(9): 3163-3171.
- Lemon, C. H. und D. V. Smith (2005). *Neural representation of bitter taste in the nucleus of the solitary tract.* J NEUROPHYSIOL **94**(6): 3719-3729.
- Li, D. und J. Zhang (2013). *Diet shapes the evolution of the vertebrate bitter taste receptor gene repertoire.* MOL BIOL EVOL.
- Li, F., J. Cao und M. Zhou (2012). *NTPDase2+ Cells Generate Lingual Epithelia and Papillae.* FRONT GENET **3**: 255.
- Li, F. und M. Zhou (2012). *Depletion of bitter taste transduction leads to massive spermatid loss in transgenic mice.* MOL HUM REPROD **18**(6): 289-297.

- Li, X., W. Li, H. Wang, J. Cao, K. Maehashi, L. Huang, A. A. Bachmanov, D. R. Reed, V. Legrand-Defretin, G. K. Beauchamp, *et al.* (2005). *Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar.* PLOS GENET **1**(1): 27-35.
- Li, X., L. Staszewski, H. Xu, K. Durick, M. Zoller und E. Adler (2002). *Human receptors for sweet and umami taste.* PROC NATL ACAD SCI U S A **99**(7): 4692-4696.
- Lin, W., T. Ogura, R. F. Margolskee, T. E. Finger und D. Restrepo (2008). *TRPM5-expressing solitary chemosensory cells respond to odorous irritants.* J NEUROPHYSIOL **99**(3): 1451-1460.
- Lindemann, B. (1996). *Taste reception.* PHYSIOL REV **76**(3): 718-766.
- Liu, D. und E. R. Liman (2003). *Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5.* PROC NATL ACAD SCI U S A **100**(25): 15160-15165.
- Livak, K. J. und T. D. Schmittgen (2001). *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* METHODS **25**(4): 402-408.
- Loßow, K. (2011). *Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen mit lichtsensitivem Geschmackssystem zur Aufklärung der neuronalen Geschmackskodierung.* Dissertation, Universität Potsdam.
- Lush, I. E. und G. Holland (1988). *The genetics of tasting in mice. V. Glycine and cycloheximide.* GENET RES **52**(3): 207-212.
- Maruyama, Y., E. Pereira, R. F. Margolskee, N. Chaudhari und S. D. Roper (2006). *Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor.* J NEUROSCI **26**(8): 2227-2234.
- Matsunami, H., J. P. Montmayeur und L. B. Buck (2000). *A family of candidate taste receptors in human and mouse.* NATURE **404**(6778): 601-604.
- McGadey, J. (1970). *A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase.* HISTOCHEMIE **23**(2): 180-184.
- McLaughlin, S. K., P. J. McKinnon und R. F. Margolskee (1992). *Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins.* NATURE **357**(6379): 563-569.
- Meyerhof, W. (2005). *Elucidation of mammalian bitter taste.* REV PHYSIOL BIOCHEM PHARMACOL **154**: 37-72.
- Meyerhof, W., C. Batram, C. Kuhn, A. Brockhoff, E. Chudoba, B. Bufe, G. Appendino und M. Behrens (2010). *The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors.* CHEM SENSES **35**(2): 157-170.
- Meyerhof, W., M. Behrens, A. Brockhoff, B. Bufe und C. Kuhn (2005). *Human bitter taste perception.* CHEM SENSES **30 Suppl 1**: i14-15.
- Meyerhof, W., S. Born, A. Brockhoff und M. Behrens (2011). *Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review.* FLAVOUR AND FRAGRANCE JOURNAL **26**(4): 260-268.

- Miller, I. J. (1995). *Anatomy of the peripheral taste system*. *Handbook of Olfaction and Gustation*. R. L. Doty: 521-547.
- Miller, I. J., Jr. (1986). *Variation in human fungiform taste bud densities among regions and subjects*. ANAT REC **216**(4): 474-482.
- Miller, I. J. und K. M. Spangler (1982). *Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat*. CHEM SENSES **7**(1): 99-108.
- Miura, H., Y. Kusakabe und S. Harada (2006). *Cell lineage and differentiation in taste buds*. ARCH HISTOL CYTOL **69**(4): 209-225.
- Miura, H., Y. Kusakabe, C. Sugiyama, M. Kawamatsu, Y. Ninomiya, J. Motoyama und A. Hino (2001). *Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse*. MECH DEV **106**(1-2): 143-145.
- Miura, H., J. K. Scott, S. Harada und L. A. Barlow (2014). *Sonic hedgehog-expressing basal cells are general post-mitotic precursors of functional taste receptor cells*. DEV DYN.
- Mosinger, B., K. M. Redding, M. R. Parker, V. Yevshayeva, K. K. Yee, K. Dyomina, Y. Li und R. F. Margolskee (2013). *Genetic loss or pharmacological blockade of testes-expressed taste genes causes male sterility*. PROC NATL ACAD SCI U S A **110**(30): 12319-12324.
- Mueller, K. L., M. A. Hoon, I. Erlenbach, J. Chandrashekar, C. S. Zuker und N. J. Ryba (2005). *The receptors and coding logic for bitter taste*. NATURE **434**(7030): 225-229.
- Murray, R. G. (1993). *Cellular relations in mouse circumvallate taste buds*. MICROSC RES TECH **26**(3): 209-224.
- Nelson, G., J. Chandrashekar, M. A. Hoon, L. Feng, G. Zhao, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2002). *An amino-acid taste receptor*. NATURE **416**(6877): 199-202.
- Nelson, G., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, Y. Zhang, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2001). *Mammalian sweet taste receptors*. CELL **106**(3): 381-390.
- Ogura, T., K. Krosnowski, L. Zhang, M. Bekkerman und W. Lin (2010). *Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells*. PLOS ONE **5**(7): e11924.
- Ogura, T., A. Mackay-Sim und S. C. Kinnamon (1997). *Bitter taste transduction of denatonium in the mudpuppy *Necturus maculosus**. J NEUROSCI **17**(10): 3580-3587.
- Oka, Y., M. Butnaru, L. von Buchholtz, N. J. P. Ryba und C. S. Zuker (2013). *High salt recruits aversive taste pathways*. NATURE **494**(7438): 472-475.
- Orsmark-Pietras, C., A. James, J. R. Konradsen, B. Nordlund, C. Soderhall, V. Pulkkinen, C. Pedroletti, K. Daham, M. Kupczyk, B. Dahlen, *et al.* (2013). *Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics*. EUR RESPIR J **42**(1): 65-78.
- Parry, C. M., A. Erkner und J. le Coutre (2004). *Divergence of T2R chemosensory receptor families in humans, bonobos, and chimpanzees*. PROC NATL ACAD SCI U S A **101**(41): 14830-14834.

- Perea-Martinez, I., T. Nagai und N. Chaudhari (2013). *Functional cell types in taste buds have distinct longevities*. PLoS ONE **8**(1): e53399.
- Perez, C. A., L. Huang, M. Rong, J. A. Kozak, A. K. Preuss, H. Zhang, M. Max und R. F. Margolskee (2002). *A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells*. NAT NEUROSCI **5**(11): 1169-1176.
- Perez, C. A., R. F. Margolskee, S. C. Kinnamon und T. Ogura (2003). *Making sense with TRP channels: store-operated calcium entry and the ion channel Trpm5 in taste receptor cells*. CELL CALCIUM **33**(5-6): 541-549.
- Pfaffmann, C. (1941). *Gustatory afferent impulses*. JOURNAL OF CELLULAR AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY **17**(2): 243-258.
- Pfaffmann, C. (1974). *SPECIFICITY OF THE SWEET RECEPTORS OF THE SQUIRREL MONKEY*. CHEM SENSES **1**(1): 61-67.
- Prandi, S., M. Bromke, S. Hubner, A. Voigt, U. Boehm, W. Meyerhof und M. Behrens (2013). *A subset of mouse colonic goblet cells expresses the bitter taste receptor *tas2r131**. PLoS ONE **8**(12): e82820.
- Prawitt, D., M. K. Monteilh-Zoller, L. Brixel, C. Spangenberg, B. Zabel, A. Fleig und R. Penner (2003). *TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i*. PROC NATL ACAD SCI U S A **100**(25): 15166-15171.
- Pronin, A. N., H. Tang, J. Connor und W. Keung (2004). *Identification of ligands for two human bitter T2R receptors*. CHEM SENSES **29**(7): 583-593.
- Pronin, A. N., H. Xu, H. Tang, L. Zhang, Q. Li und X. Li (2007). *Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin*. CURR BIOL **17**(16): 1403-1408.
- Pumplin, D. W., C. Yu und D. V. Smith (1997). *Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types*. J COMP NEUROL **378**(3): 389-410.
- Reimann, F., A. M. Habib, G. Tolhurst, H. E. Parker, G. J. Rogers und F. M. Gribble (2008). *Glucose sensing in L cells: a primary cell study*. CELL METAB **8**(6): 532-539.
- Romanov, R. A., O. A. Rogachevskaja, M. F. Bystrova, P. Jiang, R. F. Margolskee und S. S. Kolesnikov (2007). *Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells*. EMBO J **26**(3): 657-667.
- Roper, S. D. (2007). *Signal transduction and information processing in mammalian taste buds*. PFLUGERS ARCH **454**(5): 759-776.
- Roper, S. D. und N. Chaudhari (2009). *Processing umami and other tastes in mammalian taste buds*. ANN N Y ACAD SCI **1170**: 60-65.
- Rossler, P., I. Boekhoff, E. Tareilus, S. Beck, H. Breer und J. Freitag (2000). *G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction*. CHEM SENSES **25**(4): 413-421.
- Rossler, P., C. Kroner, J. Freitag, J. Noe und H. Breer (1998). *Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells*. EUR J CELL BIOL **77**(3): 253-261.
- Roudnitzky, N., B. Bufe, S. Thalmann, C. Kuhn, H. C. Gunn, C. Xing, B. P. Crider, M. Behrens, W. Meyerhof und S. P. Wooding (2011). *Genomic, genetic and functional*

- dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners.* HUM MOL GENET **20**(17): 3437-3449.
- 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**(2): G171-177.
- Rozengurt, N., S. V. Wu, M. C. Chen, C. Huang, C. Sternini und E. Rozengurt (2006). *Colocalization of the alpha-subunit of gustducin with PYY and GLP-1 in L cells of human colon.* AM J PHYSIOL GASTROINTEST LIVER PHYSIOL **291**(5): G792-802.
- Ruiz-Avila, L., S. K. McLaughlin, D. Wildman, P. J. McKinnon, A. Robichon, N. Spickofsky und R. F. Margolskee (1995). *Coupling of bitter receptor to phosphodiesterase through transducin in taste receptor cells.* NATURE **376**(6535): 80-85.
- Ruiz, C. J., K. Wray, E. Delay, R. F. Margolskee und S. C. Kinnamon (2003). *Behavioral evidence for a role of alpha-gustducin in glutamate taste.* CHEM SENSES **28**(7): 573-579.
- Sainz, E., M. M. Cavenagh, J. Gutierrez, J. F. Battey, J. K. Northup und S. L. Sullivan (2007). *Functional characterization of human bitter taste receptors.* BIOCHEM J **403**(3): 537-543.
- Sakurai, T., T. Misaka, M. Ishiguro, K. Masuda, T. Sugawara, K. Ito, T. Kobayashi, S. Matsuo, Y. Ishimaru, T. Asakura, et al. (2010). *Characterization of the beta-D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16.* J BIOL CHEM **285**(36): 28373-28378.
- Shi, P. und J. Zhang (2006). *Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes.* MOL BIOL EVOL **23**(2): 292-300.
- Shi, P., J. Zhang, H. Yang und Y. P. Zhang (2003). *Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution.* MOL BIOL EVOL **20**(5): 805-814.
- Shibutani, S., H. Dong, N. Suzuki, S. Ueda, F. Miller und A. P. Grollman (2007). *Selective toxicity of aristolochic acids I and II.* DRUG METAB DISPOS **35**(7): 1217-1222.
- Singh, N., M. Vrontakis, F. Parkinson und P. Chelikani (2011). *Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells.* BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN **406**(1): 146-151.
- Slack, J. P., A. Brockhoff, C. Batram, S. Menzel, C. Sonnabend, S. Born, M. M. Galindo, S. Kohl, S. Thalmann, L. Ostopovici-Halip, et al. (2010). *Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist.* CURR BIOL **20**(12): 1104-1109.
- Smith, D. V., S. J. John und J. D. Boughter (2000). *Neuronal cell types and taste quality coding.* PHYSIOL BEHAV **69**(1-2): 77-85.
- Soranzo, N., B. Bufo, P. C. Sabeti, J. F. Wilson, M. E. Weale, R. Marguerie, W. Meyerhof und D. B. Goldstein (2005). *Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16.* CURR BIOL **15**(14): 1257-1265.
- Soriano, P. (1999). *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain.* NAT GENET **21**(1): 70-71.

- Spector, A. C. und S. L. Kopka (2002). *Rats fail to discriminate quinine from denatonium: implications for the neural coding of bitter-tasting compounds*. J NEUROSCI **22**(5): 1937-1941.
- Steiner, J. E. (1973). *The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants*. SYMP ORAL SENS PERCEPT: 254-278.
- Steiner, J. E., D. Glaser, M. E. Hawilo und K. C. Berridge (2001). *Comparative expression of hedonic impact: affective reactions to taste by human infants and other primates*. NEUROSCI BIOBEHAV REV **25**(1): 53-74.
- Sternini, C., L. Anselmi und E. Rozengurt (2008). *Enteroendocrine cells: a site of 'taste' in gastrointestinal chemosensing*. CURR OPIN ENDOCRINOL DIABETES OBES **15**(1): 73-78.
- Stone, L. M., J. Barrows, T. E. Finger und S. C. Kinnamon (2007). *Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice*. CHEM SENSES **32**(3): 255-262.
- Sugawara, T., Y. Go, T. Uono, N. Morimura, M. Tomonaga, H. Hirai und H. Imai (2011). *Diversification of bitter taste receptor gene family in western chimpanzees*. MOL BIOL EVOL **28**(2): 921-931.
- Thalmann, S., M. Behrens und W. Meyerhof (2013). *Major haplotypes of the human bitter taste receptor TAS2R41 encode functional receptors for chloramphenicol*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN **435**(2): 267-273.
- Tizzano, M., M. Cristofolletti, A. Sbarbati und T. E. Finger (2011). *Expression of taste receptors in solitary chemosensory cells of rodent airways*. BMC PULM MED **11**: 3.
- Tizzano, M., G. Dvoryanchikov, J. K. Barrows, S. Kim, N. Chaudhari und T. E. Finger (2008). *Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue*. BMC NEUROSCI **9**: 110.
- Tizzano, M., B. D. Gulbransen, A. Vandenbeuch, T. R. Clapp, J. P. Herman, H. M. Sibhatu, M. E. Churchill, W. L. Silver, S. C. Kinnamon und T. E. Finger (2010). *Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals*. PROC NATL ACAD SCI U S A **107**(7): 3210-3215.
- Töle, J. (2013). *Über die Arc-catFISH-Methode als neues Werkzeug zur Charakterisierung der Geschmacksverarbeitung im Hirnstamm der Maus*. Dissertation, Universität Potsdam.
- Tomchik, S. M., S. Berg, J. W. Kim, N. Chaudhari und S. D. Roper (2007). *Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds*. J NEUROSCI **27**(40): 10840-10848.
- Uchida, T., A. Tanigake, Y. Miyanaga, K. Matsuyama, M. Kunitomo, Y. Kobayashi, H. Ikezaki und A. Taniguchi (2003). *Evaluation of the bitterness of antibiotics using a taste sensor*. J PHARM PHARMACOL **55**(11): 1479-1485.
- Ueda, K., M. Fujii, A. El-Sharaby, S. Honma und S. Wakisaka (2003). *Human blood group antigen H is not the specific marker for type I cells in the taste buds*. ARCH HISTOL CYTOL **66**(5): 469-473.
- Urban, J., C. J. Dahlberg, B. J. Carroll und W. Kaminsky (2013). *Absolute configuration of beer's bitter compounds*. ANGEW CHEM INT ED ENGL **52**(5): 1553-1555.

- Vandenbeuch, A., C. B. Anderson, J. Parnes, K. Enjyoji, S. C. Robson, T. E. Finger und S. C. Kinnamon (2013). *Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function*. PROC NATL ACAD SCI U S A **110**(36): 14789-14794.
- Vandenbeuch, A., T. R. Clapp und S. C. Kinnamon (2008). *Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse*. BMC NEUROSCI **9**: 1.
- Vandenbeuch, A. und S. C. Kinnamon (2009). *Why do taste cells generate action potentials?* J BIOL **8**(4): 42.
- Vandenbeuch, A., M. Tizzano, C. B. Anderson, L. M. Stone, D. Goldberg und S. C. Kinnamon (2010). *Evidence for a role of glutamate as an efferent transmitter in taste buds*. BMC NEUROSCI **11**: 77.
- Voigt, A. (2011). *Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen zur Aufklärung der peripheren und zentralen gustatorischen Kommunikationsbahnen*. Dissertation, TU Berlin.
- Voigt, A., S. Hübner, K. Lossow, I. Hermans-Borgmeyer, U. Boehm und W. Meyerhof (2012). *Genetic labeling of Tas1r1 and Tas2r131 taste receptor cells in mice*. CHEM SENSES **37**(9): 897-911.
- Warren, R. P. und R. C. Lewis (1970). *Taste polymorphism in mice involving a bitter sugar derivative*. NATURE **227**(5253): 77-78.
- Wauson, E. M., E. Zaganjor, A. Y. Lee, M. L. Guerra, A. B. Ghosh, A. L. Bookout, C. P. Chambers, A. Jivan, K. McGlynn, M. R. Hutchison, et al. (2012). *The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy*. MOL CELL **47**(6): 851-862.
- Whitney, G. und D. B. Harder (1986). *Single-locus control of sucrose octaacetate tasting among mice*. BEHAV GENET **16**(5): 559-574.
- Wiener, A., M. Shudler, A. Levit und M. Y. Niv (2012). *BitterDB: a database of bitter compounds*. NUCLEIC ACIDS RES **40**(Database issue): D413-419.
- Wilson, D. M., J. D. Boughter, Jr. und C. H. Lemon (2012). *Bitter taste stimuli induce differential neural codes in mouse brain*. PLOS ONE **7**(7): e41597.
- Wong, G. T., K. S. Gannon und R. F. Margolskee (1996). *Transduction of bitter and sweet taste by gustducin*. NATURE **381**(6585): 796-800.
- Wong, G. T., L. Ruiz-Avila und R. F. Margolskee (1999). *Directing gene expression to gustducin-positive taste receptor cells*. J NEUROSCI **19**(14): 5802-5809.
- Wu, S. V., M. C. Chen und E. Rozengurt (2005). *Genomic organization, expression, and function of bitter taste receptors (T2R) in mouse and rat*. PHYSIOL GENOMICS **22**(2): 139-149.
- Wu, S. V., N. Rozengurt, M. Yang, S. H. Young, J. Sinnett-Smith und E. Rozengurt (2002). *Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells*. PROC NATL ACAD SCI U S A **99**(4): 2392-2397.
- Xu, J., J. Cao, N. Iguchi, D. Riethmacher und L. Huang (2013). *Functional characterization of bitter-taste receptors expressed in mammalian testis*. MOL HUM REPROD **19**(1): 17-28.

- Yajima, H., E. Ikeshima, M. Shiraki, T. Kanaya, D. Fujiwara, H. Odai, N. Tsuboyama-Kasaoka, O. Ezaki, S. Oikawa and K. Kondo (2004). *Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma and reduce insulin resistance*. J BIOL CHEM **279**(32): 33456-33462.
- Yan, W., G. Sunavala, S. Rosenzweig, M. Dasso, J. G. Brand and A. I. Spielman (2001). *Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides*. AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL **280**(4): C742-751.
- Yang, R., H. H. Crowley, M. E. Rock and J. C. Kinnamon (2000). *Taste cells with synapses in rat circumvallate papillae display SNAP-25-like immunoreactivity*. J COMP NEUROL **424**(2): 205-215.
- Yee, C. L., R. Yang, B. Bottger, T. E. Finger and J. C. Kinnamon (2001). *"Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin*. J COMP NEUROL **440**(1): 97-108.
- Yoshida, R., A. Miyauchi, T. Yasuo, M. Jyotaki, Y. Murata, K. Yasumatsu, N. Shigemura, Y. Yanagawa, K. Obata, H. Ueno, *et al.* (2009). *Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells*. J PHYSIOL **587**(Pt 18): 4425-4439.
- Zaidi, F. N. und M. C. Whitehead (2006). *Discrete innervation of murine taste buds by peripheral taste neurons*. J NEUROSCI **26**(32): 8243-8253.
- Zancanaro, C., C. M. Caretta, F. Merigo, A. Cavaggioni und F. Osculati (1999). *alpha-Gustducin expression in the vomeronasal organ of the mouse*. EUR J NEUROSCI **11**(12): 4473-4475.
- Zhang, C. H., L. M. Lifshitz, K. F. Uy, M. Ikebe, K. E. Fogarty und R. ZhuGe (2013). *The cellular and molecular basis of bitter tastant-induced bronchodilation*. PLOS BIOL **11**(3): e1001501.
- Zhang, Y., M. A. Hoon, J. Chandrashekar, K. L. Mueller, B. Cook, D. Wu, C. S. Zuker und N. J. Ryba (2003). *Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways*. CELL **112**(3): 293-301.
- Zhao, G. Q., Y. Zhang, M. A. Hoon, J. Chandrashekar, I. Erlenbach, N. J. Ryba und C. S. Zuker (2003). *The receptors for mammalian sweet and umami taste*. CELL **115**(3): 255-266.
- Zhao, H., J. R. Yang, H. Xu und J. Zhang (2010). *Pseudogenization of the umami taste receptor gene *Tas1r1* in the giant panda coincided with its dietary switch to bamboo*. MOL BIOL EVOL **27**(12): 2669-2673.

7 Anhang

Tabelle 42: Experimentell bestimmte Effizienz von für quantitative *Real-Time*-PCRs genutzten *TaqMan*-Assays, sowie Sequenz-Identität mit der gesuchten Sequenz von erhaltenen PCR-Produkten.

<i>TaqMan</i> -Assay	Firma	Anstieg	y-Schnittpunkt	Pearson-Korrelationskoeffizient (R^2)	Effizienz in %	Sequenz-Identität in %
Tas2r102	MWG	-3,678	29,067	0,999	87,02	100
Tas2r103	MWG	-3,089	36,635	0,962	110,74	100
Tas2r104	MWG	-3,521	29,918	0,995	92,31	100
Tas2r105	MWG	-3,340	22,885	0,988	99,26	100
Tas2r106	ABI	-3,678	30,464	0,997	87,02	100
Tas2r107	MWG	-3,429	37,115	0,953	95,72	100
Tas2r108	MWG	-3,444	28,162	0,999	95,13	100
Tas2r109*	MWG	-3,471	27,013	0,998	94,12	99-100 99 mit Tas2r117
Tas2r109	MWG	-3,429	37,115	0,953	95,72	100
Tas2r110	MWG	-3,614	35,976	0,968	89,12	99, 93 mit Tas2r123
Tas2r113	ABI	-3,481	30,238	0,998	93,76	100
Tas2r114	MWG	-2,904	37,099	0,969	98,18	100
Tas2r115	ABI	-3,709	38,048	0,982	86,05	99
Tas2r116	MWG	-3,411	32,771	0,994	96,41	100
Tas2r117	ABI	-3,392	29,546	0,999	97,14	100
Tas2r118	MWG	-3,557	29,591	0,998	91,04	100
Tas2r119	MWG	-3,358	34,556	0,989	98,50	100
Tas2r120	MWG	-3,236	34,746	0,975	103,72	100
Tas2r121	MWG	-3,299	33,089	0,989	100,97	100
Tas2r122	MWG	-3,429	29,710	0,998	95,73	100
Tas2r123	MWG	-3,657	29,512	0,998	87,69	100
Tas2r124	MWG	-3,553	38,238	0,94	91,17	100
Tas2r125	MWG	-3,500	28,908	0,999	93,08	100
Tas2r126	MWG	-3,438	36,078	0,983	95,36	100
Tas2r129	MWG	-3,431	37,769	0,919	95,63	100
Tas2r130	MWG	-3,564	28,561	0,997	90,81	100
Tas2r131	MWG	-3,357	34,992	0,961	98,55	100
Tas2r134	MWG	-3,53	32,308	0,997	92,01	100
Tas2r135	MWG	-3,473	31,436	0,994	94,06	100
Tas2r136	MWG	-3,329	31,588	0,993	99,72	100
Tas2r137	MWG	-3,5	31,643	0,99	93,08	100
Tas2r138	MWG	-3,452	32,817	0,991	94,84	100
Tas2r139	MWG	-3,538	32,279	0,992	91,72	100
Tas2r140	ABI	-3,298	38,806	0,919	101,02	100
Tas2r143	ABI	-3,660	30,147	0,993	87,60	100
Tas2r144	ABI	-3,517	28,648	0,996	92,45	100
NTPdase2	MWG	-3,633	29,617	0,995	88,49	97

TaqMan-Assay	Firma	Anstieg	y-Schnittpunkt	Pearson-Korrelationskoeffizient (R ²)	Effizienz in %	Sequenz-Identität in %
α-Gustducin	MWG	-3,544	29,427	0,974	91,51	100
Snap25	MWG	-3,365	35,996	0,976	98,24	99
Tas1r1	ABI	-3,463	35,152	0,874	94,42	100
Tas1r2	ABI	-3,332	34,141	0,980	97,73	99
Tas1r3	MWG	-3,516	31,763	0,993	92,50	100
β-Aktin	MWG	-3,385	24,804	0,984	97,43	100

Es wird deutlich, dass die PCR-Effizienz der meisten Reaktionen (vorletzte Spalte Tabelle 42) zwischen 90% und 100% liegt und diese PCR-Reaktionen somit eine hohe Vergleichbarkeit aufweisen. Alle anderen PCR-Effizienz-Werte liegen mindestens über 87% bzw. unter 111%.

Auch die Sequenzidentitäten der in der qRT-PCR erhaltenen PCR-Produkte (letzte Spalte Tabelle 42) können mittels der exemplarischen Sequenzierungen bestätigt werden. Die Fragmente sind fast immer zu 100%, jedoch mindestens zu 99%, nur im Fall von NTPDase2 zu 97%, mit der gesuchten Sequenz übereinstimmend. Bei einer 99%-Übereinstimmung passt nur eine Base der amplifizierten Sequenz nicht mit der gesuchten Sequenz überein, bei einer 97%igen Übereinstimmung nur zwei Basen. Jedoch die Identität der gesuchten Sequenz ist immer die richtige. Im Falle von Tas2r109*, wo eine 99%ige Ähnlichkeit der qRT-PCR-Produktes zu einem Tas2r117-Sequenzabschnitt auftauchte, wurde ein neuer Tas2r109-TaqMan-Assay generiert. Dieser erwies sich als spezifisch, mit einer qRT-PCR-Produkt-Sequenz-Identität von 100%. In einem Fall, nämlich für das untersuchte Tas2r110-spezifische qRT-PCR-Produkt, besteht allerdings eine 93%ige Ähnlichkeit zu einem Sequenzabschnitt von Tas2r123 [701 bp–776 bp Referenz-Sequenz *GRCm38.p2 C57BL6/J, NC_000072.6* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)].

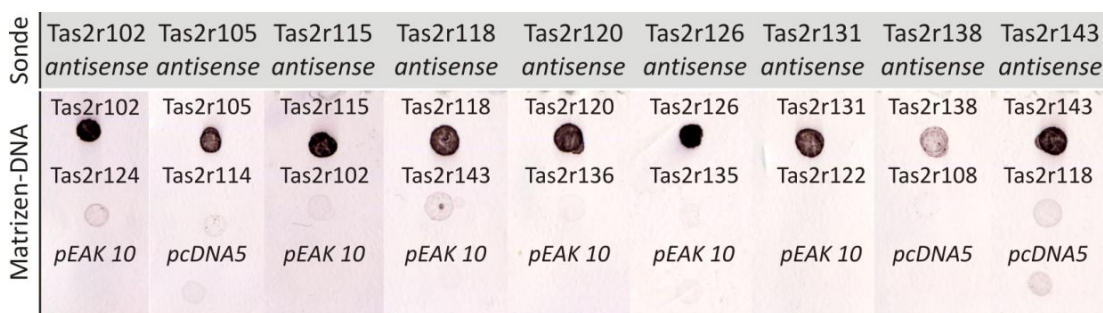


Abbildung 37: Überprüfung der Spezifität der in der ISH genutzten Sonden in Dot-Blot-Hybridisierungen. Auf die Membranen wurden jeweils 3 Punkte mit DNA aufgetragen. Der obere Punkt enthielt 1 ng Vektor mit der gesamten kodierenden Sequenz des jeweils angegebenen Bitterrezeptors als *Insert*, der mittlere Punkt enthielt 1 ng von DNA des Vektors mit der kodierenden Sequenz des nächstähnlichen Bitterrezeptors als *Insert*, der untere Punkt enthielt 1 ng der DNA des entsprechenden Leervektors.

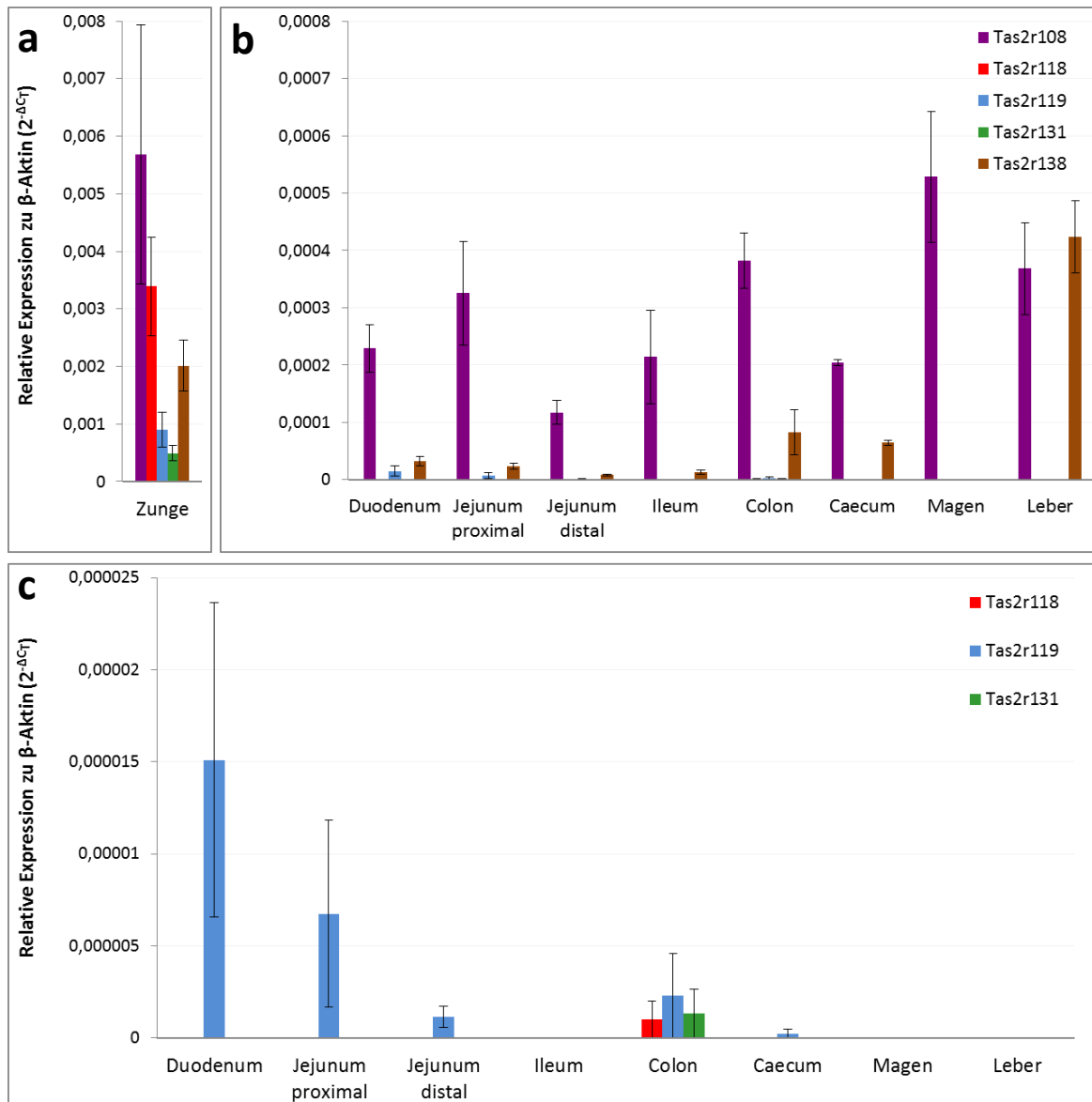


Abbildung 38: Relative Expression von Bitterrezeptoren (Tas2r108, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r131 und Tas2r138) in Zungen- und Magen-Darm-Trakt-Geweben sowie in Leber von C57BL/6-Mäusen. Unter Verwendung von cDNA (2.2.3.3, Seite 42) als Matrize, wurden (a) Tas2r108, Tas2r118, Tas2r119, Tas2r131 und Tas2r138 in Zungengewebe (ausgestanzte Wallpapille) nachgewiesen. In denselben Tieren wurde die Expression dieser Rezeptoren im Magen-Darmtrakt und in der Leber untersucht (b). Tas2r138-Expression ist deutlich in allen untersuchten Geweben nachweisbar, ebenfalls Tas2r108-Expression – außer im Magen. Eine Expression von Tas2r118, Tas2r119 und Tas2r131 ist innerhalb des Magen-Darm-Traktes nur in ausgewählten Darm-Geweben nachweisbar (c). Dabei ist Tas2r119 am stärksten in *Duodenum* (Zwölffingerdarm) exprimiert, schwächer im *Jejunum* (Leerdarm), und am schwächsten in Kolon und *Caecum* (Blinddarm) und dort jeweils auch nur in einem von vier untersuchten Tieren. Tas2r118- und Tas2r131-mRNA-Expression ist nur im Kolon nachweisbar, jedoch auch jeweils nur in einem von drei bzw. vier untersuchten Tieren.

n = 3 für Tas2r131-Expressionanalysen, n = 4 für Tas2r108-, Tas2r118-, Tas2r119- und Tas2r138-Expressionanalysen; Werte sind Mittelwerte \pm SE

Tabelle 43: Ergebnisse von /SH-Experimenten in Wallpaperillen-Schnitten von homozygoten Tas2r131^{BLIG}-Mäusen. Ausgezählte Werte einzelner Tiere.

Tas2r131 ^{BLIG/BLIG}										
Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Quer- schnitt	hrGFP- positive Zellen ± SD	% hrGFP- positive Zellen. ± SD	Rezeptor- mRNA- positive Zellen ± SD	% Rezeptor- mRNA- positive Zell ± SD	hrGFP+Reze- ptor-mRNA- pos.Zellen ± SD	% hrGFP+Reze ptor-mRNA- pos.Zellen ± SD	% positive Überlage- rung mit Tas2r131 ± SD		
Tas2r102	Tier 409 /SH 11.07.12	25,19	1,91	7,57	1,22	4,84	0,97	3,85	79,49	
	f414 /SH 11.07.12	22,74	1,26	5,53	0,74	3,26	0,61	2,70	82,61	
MW Tas2r102		23,96	1,58	6,55	0,98	4,05	0,79	3,27	81,05	
	Tier 409 /SH 11.07.12	24,50	1,96	7,99	2,08	8,50	1,46	5,95	70,00	
	f413 /SH 18.07.12	22,76	1,40	6,17	1,83	8,05	1,36	5,96	74,03	
MW Tas2r105		23,63	1,68	7,08	1,96	8,28	1,41	5,96	72,01	
	f414 /SH 18.07.12	21,07	0,93	4,39	1,04	4,92	0,59	2,81	57,14	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
MW Tas2r114		21,07	0,93	4,39	1,04	4,92	0,59	2,81	57,14	
	Tier 409 /SH 11.07.12	21,77	1,81	8,30	1,45	6,67	1,39	6,37	95,56	
	f414 /SH 11.07.12	23,67	1,19	5,01	1,33	5,63	1,11	4,69	83,33	
MW Tas2r115		22,72	1,50	6,65	1,39	6,15	1,25	5,53	89,44	
	f413 /SH 18.07.12	22,25	1,38	6,18	2,13	9,55	1,25	5,62	58,82	
	4894/4 m2 /SH 09.01.13	23,08	2,23	9,65	3,60	15,62	2,09	9,08	58,12	

7 Anhang

Tas2r131 ^{BLIG/BLIG}											
Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	hrGFP-positive Zellen ± SD	% hrGFP-positive Zellen.	Rezeptor-mRNA-positive Zellen ± SD	% Rezeptor-mRNA-positive Zell	hrGFP+Reze ptor-mRNA-pos.Zellen ± SD	% hrGFP+Reze ptor-mRNA-pos.Zellen	% positive Überlage rung mit Tas2r131	± SD		
MW Tas2r118	22,66	1,80	7,91	2,45	12,58	4,29	1,67	7,35	2,45	58,47	0,50
Tier 409 /SH 11.07.12	20,90	1,67	7,97	0,62	2,96	0,62	0,62	2,96		100,00	
f414 /SH 11.07.12	20,11	1,20	5,97	0,60	2,98	0,60	0,60	2,98		100,00	
MW Tas2r120	20,51	1,43	6,97	1,42	2,97	0,02	0,61	2,97	0,02	100,00	0,00
Tier 409 /SH 11.07.2012	23,66	1,83	7,73	2,28	9,62	1,52	1,52	6,41		66,67	
f414 /SH 11.07.2012	21,95	1,51	6,90	1,59	7,27	1,00	1,00	4,56		62,71	
4894/4 m2 (SH 09.01.13)	22,35	2,10	9,40	3,30	14,77	2,05	2,05	9,17		62,12	
MW Tas2r138	22,65	1,81	8,01	1,27	10,55	1,67	1,52	6,71	2,32	63,83	2,47
f414 /SH 11.07.2012	19,92	1,20	6,02	2,00	10,04	1,12	1,12	5,62		56,00	
f413 /SH 18.07.2012	20,11	1,16	5,78	2,50	12,43	1,16	1,16	5,75		46,25	
4894/4 m2 /SH 09.01.13	26,38	2,20	8,34	4,50	17,06	2,20	2,20	8,34		48,89	
MW α-Gustducin	22,14	1,52	6,71	1,41	13,18	3,57	1,49	6,57	1,53	50,38	5,04

MW = Mittelwert

Tabelle 44: Ergebnisse von ISH-Experimenten in Wallpapillen-Schnitten von Mäusen mit ablatierten Tas2r131-Zellen (Tas2r131^{+^{BLIC}/R26^{+^{DTA}}) im Vergleich zu Kontroll-(Tas2r131^{+^{BLIC}/R26^{+^{DTA}}) und homozygoten Tas2r131-knock-out-Mäusen (Tas2r131^{BLIG/BLIG}). Ausgezählte Werte einzelner Tiere.}}

	Tas2r131 ^{+^{BLIC}/R26^{+^{DTA}}}						Tas2r131 ^{BLIG/BLIG}						% positive Überlagerung mit Tas2r131
	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	± SD	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	± SD	
Tas2r102	4702/5 m2 ISH 27.06.12	20,31	0,31	1,54	16,50	1,83	11,11	18,44	0,89	4,82			
	4703/6 f8 ISH 09/12	24,00	0,35	1,46	19,50	2,00	10,26	19,76	1,67	8,43			
MW Tas2r102		22,16	0,33	0,03	1,50	0,06	9,26	19,10	1,28	0,55	6,63	2,56	83,83
Tas2r105	4703/6 f7 ISH 27.06.12	21,90	0,77	3,50	17,76	2,04	11,49	15,35	1,61	10,50			
	4702/5 m2 ISH 13.06.12	22,30	0,82	3,67	19,44	2,13	10,93	17,85	2,41	13,49			
MW Tas2r105		22,10	0,79	0,04	3,58	0,12	11,21	16,60	2,01	0,56	11,99	2,11	68,02
Tas2r115	4776/3 m2 ISH 23.05.12	20,91	0,14	0,65	18,67	1,33	7,14	19,88	1,92	9,64			
	4702/5 m2 ISH 13.06.12	17,36	0,18	1,05	20,28	1,21	5,95	20,16	1,24	6,17			
MW Tas2r115		19,14	0,16	0,03	0,85	0,28	7,66	20,02	1,58	0,48	7,90	2,46	88,91
Tas2r118	4776/3 m2 ISH 23.05.12	24,50	1,83	7,48	20,18	3,00	14,86	20,63	2,84	13,78			
	4702/5 m2 ISH 13.06.12	21,68	1,48	6,83	17,97	2,45	13,66	18,63	2,37	12,70			
MW Tas2r118		23,09	1,66	0,25	7,15	0,46	15,12	19,63	2,60	0,34	13,24	0,76	52,69

7 Anhang

	Tas2r131 ^{+/+} /R26 ^{DTA+/-}					Tas2r131 ^{+/+} /R26 ^{DTA+/-}					Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}					% positive Überlagerung mit Tas2r131
	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	
Tas2r120	4776/3 m2 ISH 21.05.12	0,00	0,00	0,00	0,00	4776/3 m7 ISH 21.05.12	18,11	0,79	4,36	4142/3 m2 ISH 21.05.12	18,23	0,77	4,22			
	4702/5 m2 ISH 27.06.12	0,00	0,00	0,00	0,00	4703/6 f5 ISH 27.06.12	18,56	1,21	6,50	f411 ISH 04.06.12	16,83	0,83	4,95			
MW Tas2r120	-	0,00	0,00	0,00	0,00	18,33	1,00	0,29	5,43	1,51	17,26	0,85	0,05	4,93	0,71	
Tas2r126	4887/3 f5 ISH 03.07.13	22,56	1,88	8,33	0,00	5274/5 f1 ISH 03./08.07.13	21,79	1,53	7,02	5398/2 m2 ISH 03.07.13	20,58	2,38	11,59			
	5274/4 m2 ISH 03.07.13	20,69	1,81	8,74	0,00	5274/5 f3 ISH 03.07.13	20,27	2,45	12,11	m417 ISH 03.07.13	20,41	1,95	9,58			
MW Tas2r126	21,63	1,84	0,05	8,53	0,28	21,03	1,99	0,65	9,56	3,60	20,49	2,17	0,30	10,58	1,42	
Tas2r131	4776/3 m2 ISH 29.05.12	0,00	0,00	0,00	0,00	4776/3 m3 ISH 21.05.12	20,85	2,15	10,33	4142/3 m2 ISH 21.05.12	0,00	0,00	0,00			
	4703/6 f7 ISH 27.06.12	0,00	0,00	0,00	0,00	4776/3 m7 ISH 21.05.12	18,21	1,71	9,41	4142/3 m2 ISH 29.05.12	0,00	0,00	0,00			
MW Tas2r131	-	0,00	0,00	0,00	0,00	22,75	1,50	6,59	8,78	1,95	-	0,00	0,00	0,00	0,00	
Tas2r138	4776/3 m2 ISH 29.05.12	20,35	1,41	6,94	0,00	4776/3 m7 ISH 14.05.12	20,83	2,37	11,39	4142/3 m1 ISH 14.05.12	17,96	2,46	13,72			
	4702/5 m2 ISH 18.8.12	19,57	1,52	7,79	0,00	4776/3 m3 ISH 14.05.12	16,82	2,29	13,64	4142/3 m2 ISH 29.05.12	21,47	2,53	11,79			
MW Tas2r138	19,96	1,47	0,08	7,36	0,60	18,83	2,33	0,05	12,51	1,59	19,72	2,50	0,05	12,75	1,36	
Tas2r143	4887/3 f5 ISH 08.07.13	26,50	1,17	4,40	0,00	5274/5 f1 ISH 08.07.13	32,44	1,56	4,79	5398/2 m2 ISH 08.07.13	25,44	1,11	4,37			
	5274/4 m2 ISH 08.07.13	25,26	1,11	4,38	0,00	5274/5 f3 ISH 08.07.13	20,87	1,10	5,27	m417 ISH 08.07.13	24,91	1,27	5,11			
MW Tas2r143	25,88	1,14	0,04	4,39	0,02	26,66	1,33	0,32	5,03	0,34	25,18	1,19	0,11	4,74	0,53	

	Tas2r131 ^{+/BLIC} /R26 ^{DTA+/-}					Tas2r131 ^{+/4} /R26 ^{DTA+/-}					Tas2r131 ^{BLIG/BLIG}					% positive Überlagerung mit Tas2r131
	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	Tier Bezeichnung/ Nummer	Zellzahl pro Querschnitt	mRNA-positive Zellen	% positive Zellen	± SD	
	α-Gustducin	4703/6 f7 ISH 27.06.12	19,40	2,30	11,86		4703/6 f2 ISH 27.06.12	21,88	4,63	21,14		f411 ISH 31.05.12	16,97	3,58	21,07	
	4703/6 f7 ISH 27.06.12	21,46	3,22	15,00		4776/1 m2 ISH 23.05.12	21,83	4,75	21,76		f412 ISH 27.06.12	18,24	4,00	21,93		
MW α-Gustducin		20,43	2,76	0,65	2,22		21,85	4,69	0,09	21,45	0,43	17,60	3,79	0,30	21,50	0,61
																37,40

MW = Mittelwert

Tabelle 45: Werte der Korrelationsanalyse – mRNA-Expressionslevel und -Expressionshäufigkeit.

	Expressionslevel (qRT-PCR)						Expressionshäufigkeit (ISH)								
	VP+FoP			VP - Geschmacksknospe			Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}		Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}		Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}		Tas2r131 ^{BLUG/BLUG} /R26 ^{+/DTA}		
	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	± SD	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	± SD	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	± SD	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	± SD	% markierte Zellen	± SD	% markierte Zellen	± SD	Mittelwert Extrapolation	± SD	Berechnung
Tas2r102	0,0033	0,0029	0,0031	0,001	0,0018	0,0004	0,0027	0,0008	4,1	1,1	6,6	2,6	6,67	2,60	43,3
Tas2r103	0,0014	0,0006			0,001	0,0001	0,0012	0,0003					5,38		35,0
Tas2r104	0,0057	0,0014			0,0035	0,0003	0,0046	0,0016					9,34		60,8
Tas2r105	0,0033	0,0011	0,0053	0,0019	0,0035	0,0006	0,0040	0,0011	8,3	0,3	12	2,1	10,50	1,95	68,4
Tas2r106	0,005	0,0002			0,0026	0,0004	0,0038	0,0017					8,41		54,8
Tas2r107	0,001	0,0003			0,001	0,0002	0,0010	0,0000					5,15		33,5
Tas2r108	0,0095	0,0057			0,0053	0,0004	0,0074	0,0030					12,61		82,1
Tas2r109	0,0005	0,0002			0,0005	0,0001	0,0005	0,0000					4,56		29,7
Tas2r110	0,0026	0,0008			0,0017	0,0002	0,0022	0,0006					6,49		42,2
Tas2r113	0,0023	0,0005			0,0016	0,0004	0,0020	0,0005					6,25		40,7
Tas2r114	0,0001	<0,0001	0,0001	0,0001	0,0005	0,0002	0,0002	0,0002					4,25		27,7
Tas2r115	0,001	0,0003			0,0004	<0,0001	0,0007	0,0004	6,2	0,7	7,9	2,5	7,27	0,93	47,3
Tas2r116	0,0049	0,0012			0,0038	0,0008	0,0044	0,0008					9,05		58,9
Tas2r117	0,002	0,0004			0,0024	0,0004	0,0022	0,0003					6,54		42,6
Tas2r118	0,0075	0,0019	0,0106	0,0031	0,0098	0,0015	0,0093	0,0016	12,6	4,3	13,3	0,8	13,67	1,29	89,0
Tas2r119	0,0011	0,0003			0,0019	0,0003	0,0015	0,0006					5,73		37,3
Tas2r120	0,001	0,0001	0,0013	0,0001	0,0024	0,0004	0,0016	0,0007	3	0,1	4,9	0,7	4,43	1,27	28,9
Tas2r121	0,0043	0,0016			0,002	0,0002	0,0032	0,0016					7,65		49,8
Tas2r122	0,0002	0,0001			0,0002	0,0001	0,0002	0,0000					4,21		27,4
Tas2r123	0,0017	0,0003			0,001	0,0001	0,0014	0,0005					5,55		36,2
Tas2r124	0,0015	0,0009			0,0007	0,0001	0,0011	0,0006					5,26		34,3
Tas2r125	0,002	0,0013			0,0013	0,0002	0,0017	0,0005					5,90		38,4

Expressionslevel (qRT-PCR) **Expressionshäufigkeit (ISH)**

	VP+FoP				VP - Geschmacksknospe				Berechnung				
	C57BL/6		Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}		Tas2r131 ^{BLUG/BLUG}		Tas2r131 ^{+/+/R26^{-flox}/DTA}						
	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	± SD	Mittelwert 2 ^{-ΔCT}	± SD	% markierte Zellen	± SD	% markierte Zellen	± SD					
Tas2r126	0,0088	0,0036	0,0042	0,0007	0,0065	0,0033	10,6	1,4	9,6	3,6	10,10	0,71	65,8
Tas2r129	0,0026	0,0016	0,0012	0,0002	0,0019	0,0010					6,20		40,3
Tas2r130	0,0019	0,0008	0,0012	0,0002	0,0016	0,0005					5,79		37,7
Tas2r131	0,0009	0,0002	0	0,0009	0,0010	0,0011	7,1	0,6	8,8	2	7,95	1,20	51,8
Tas2r134	0,0022	0,001	0,0013	0,0003	0,0018	0,0006					6,02		39,2
Tas2r135	0,0094	0,0052	0,0042	0,0002	0,0068	0,0037					11,91		77,5
Tas2r136	0,0008	0,0004	0,0004	0,0001	0,0006	0,0003					4,68		30,5
Tas2r137	0,0105	0,0036	0,0047	0,0008	0,0076	0,0041					12,84		83,6
Tas2r138	0,0043	0,0011	0,0044	0,001	0,0045	0,0002	10,6	1,7	12,8	1,6	11,97	1,19	77,9
Tas2r139	0,0055	0,0028	0,003	0,0003	0,0043	0,0018					8,94		58,2
Tas2r140	0,0002	<0,0001	0,0007	0,0001	0,0005	0,0004					4,50		29,3
Tas2r143	0,0019	0,0009	0,0009	0,0001	0,0014	0,0007	4,7	0,5	5	0,3	4,85	0,21	31,6
Tas2r144	0,0009	0,0003	0,0003	<0,0001	0,0006	0,0004					4,68		30,5
α-Gustducin	0,0488	0,0103	0,0604	0,0154	0,0591	0,0075	13,2	3,6	21,5	0,4	18,73	4,79	

Bitterzellen		MW	
15,36		0,0027	
7,81		MW	
17,79		Tas2r je Bitterzelle	

Legende

- ausgeschlossene Werte
- bestimmte Mittelwerte
- hrGFP
- extrapolierte Werte

Korrelationen

Deskriptive Statistiken

	Mittelwert	Standardabweichung	N
Expressionshäufigkeit	8,6011	3,16799	9
Expressionslevel	,003589	,0028269	9

Korrelationen

		Expressionshäufigkeit	Expressionslevel
Expressionshäufigkeit	Korrelation nach Pearson	1	,845**
	Signifikanz (2-seitig)		,004
	Quadratsummen und Kreuzprodukte	80,289	,061
	Kovarianz	10,036	,008
	N	9	9
Expressionslevel	Korrelation nach Pearson	,845**	1
	Signifikanz (2-seitig)	,004	
	Quadratsummen und Kreuzprodukte	,061	,000
	Kovarianz	,008	,000
	N	9	9

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Abbildung 39: Ergebnis der bivariaten Korrelationsanalyse nach *Pearson* aus *SPSS*. Der Zusammenhang zwischen mRNA-Expressionslevel und -Expressionshäufigkeit wurde analysiert.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst gilt mein Dank Prof. Wolfgang Meyerhof, nicht nur für die Betreuung meiner Doktorarbeit, sondern auch besonders für die sehr guten experimentellen und finanziellen Möglichkeiten, die er mir in seiner Abteilung geboten hat.

Als nächstes danke ich Prof. Sigrun Korsching und Prof. Heinz Breer, dass sie sich als Gutachter meiner Dissertation bereit erklärt haben.

Weiter möchte ich allen Kollegen meiner Arbeitsgruppe, die mich in den letzten Jahren begleitet haben, für die gute Arbeitsatmosphäre und jegliche Unterstützung danken. Hervorheben möchte ich Dr. Anja Voigt, der ich insbesondere für zahlreiche interessante und konstruktive Diskussionen, für ihr enges und freundschaftliches Teamwork und für das Zusammenhalten der Arbeitsgruppe danke. Sabine Frenzel und Antje Stolzenburg danke ich besonders für ihre Unterstützung meiner Experimente durch ihre *Lickometer*-Analysen. Josefine Würfel und Stefanie Demgensky bin ich sehr dankbar für ihre Hilfsbereitschaft und hervorragende experimentelle Unterstützung, vor allem in der letzten Zeit meiner Doktorarbeit. Nicht zu vergessen sind Dr. Kristina Loßow, der ich v. a. für die Bereitstellung ihrer „Bitterrezeptor-Plasmide“ danke, und Dr. Jonas Töle, der unsere Gruppe komplettierte; sowie Ellen Schöley-Pohl und Robert Kuhnert, die in meiner Anfangszeit unsere Arbeitsgruppe als technische Mitarbeiter unterstützten.

Julia Freydank war „meine“ sehr fleißige Bachelorstudentin, deren Arbeit einen wichtigen Teil meiner Experimente ausmacht. Wichtige Beiträge leisteten außerdem die Praktikanten bzw. Studenten Josephine Bönick, Anne Zemella, Corinna Neuber, Johanna Walther, Sandra Stanke und Maria Krämer.

Allen weiteren Kollegen der Abteilung Molekulare Genetik möchte ich für die gute Zusammenarbeit und eine angenehme Arbeitsatmosphäre danken. Um nur einige davon zu nennen, danke ich: Juliane Bojahr als angenehme und hilfsbereite Kollegin in jeglicher Hinsicht; Dr. habil Maik Behrens, Korrekturleser dieser Arbeit; Dr. Natacha Roudnitzky als unterstützende Statistik-Expertin; Nancy Ewert und Juliane Schlick sowie Peggy Großmann, Ulrike Redel und Horst Maischack als Kollegen für „fundamentale Belange“, ohne die die Abteilung MOGE nicht funktionieren würde. Aber auch alle anderen, hier nicht namentlich genannten Kollegen der MOGE, waren wichtig... –DANKE!

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Max-Rubner-Laboratoriums des *DIfE*. Dabei danke ich insbesondere Dr. Reinhart Kluge, Dr. Beate Liehl, Elke Thom und Dr. Stephanie Krämer, v. a. für ihre wertvollen Hinweise zum Umgang mit Mäusen und ihre Hilfe bei diversen Präparationen. Überdies danke ich den Tierpflegern für die Betreuung der Versuchstiere.

Ein Dankeschön möchte ich auch Dr. Nadja Schulz aus der Abteilung DIAB aussprechen, die sich dafür Zeit genommen hat, mir das *Real-Time-PCR*-System näher zu bringen.

Im Labor von Prof. Stephen Roper (Miller School of Medicine, University of Miami) wurden mir die Isolation einzelner Geschmacksrezeptorzellen und deren Stimulation gezeigt. Ich danke ihm und seinen Kollegen, Dr. Jeff Grant, Dr. Anthony Huang, Dr. Robin Dando und Dr. René Barro-Soria, dafür. Ebenso danke ich Dr. Gennady Dvoryanchikov für die Demonstration des Einzelzell-Pickings. Prof. Stephen Roper und Prof. Nirupa Chaudhari bin ich darüber hinaus sehr dankbar für ihre außerordentliche Gastfreundlichkeit. Dasselbe gilt für Isabel Perea-Martinez.

Prof. Ulrich Boehm und PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer sei gedankt für ihre Kooperation bei der Generierung der Mauslinien, die ich in dieser Arbeit untersuchte.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und selbstverständlich Ronny – die mich immer gestützt und unterstützt haben, so gut, wie sie nur konnten.

Danke, an euch alle!

Selbständigkeitserklärung

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, September 2014

Sandra Hübner