

**Einfluss der N-Glykosylierung und des C-Terminus
auf die Protein-Proteinwechselwirkungen
der rTas1r-Familie der Süßgeschmacksrezeptoren**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Bettina Walter
aus Mölln

Hamburg 2006

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von September 2003 bis Mai 2006 am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie und im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Hahn

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Schmale

Datum der Disputation: 02.02.2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Wahrnehmung der verschiedenen Geschmacksmodalitäten	1
1.2	Molekulare Grundlagen des Geschmacks	4
1.2.1	Molekulare Grundlagen des Geschmacks für sauer und salzig	4
1.2.2	Molekulare Grundlagen des Geschmacks für bitter, umami und süß	5
1.3	Die Rezeptoren der Tas1R-Familie	8
1.4	Hypothesen zur Kodierung der Geschmacksmodalitäten	11
1.5	Sekretorischer Weg	12
1.5.1	N-verknüpfte Glykosylierung	14
1.5.2	Molekulare Chaperone und Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum	16
1.6	C-terminal interagierende Proteine und ihre funktionelle Rolle bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	18
1.7	Zielsetzung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Material	23
2.1.1	Firmenverzeichnis	23
2.1.2	Chemikalien	24
2.1.3	Enzyme	25
2.1.4	Antikörper	25
2.1.5	Nukleotidsequenzen und GenBank-Zugriffsnummern	26
2.1.6	Oligonukleotide	27
2.1.7	Zur Verfügung gestellte Plasmide	31
2.1.8	Konstruierte Plasmide	32
2.1.9	Zell-Linien, Bakterien - und Hefestämme	35
2.1.10	Geräte	36
2.2	Methoden	37
2.2.1	DNA: Molekularbiologische Methoden	37
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR; <i>polymerase chain reaction</i>)	37
2.2.1.2	Gerichtete Mutagenese über PCR	38
2.2.1.3	DNA-Gelelektrophorese	39
2.2.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.2.1.5	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen	40
2.2.1.6	Dephosphorylierung von DNA	40
2.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	41

2.2.1.8	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E.Coli</i>	41
2.2.1.9	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	42
2.2.1.10	DNA-Sequenzierung	42
2.2.2	RNA: Molekularbiologische Methoden	42
2.2.2.1	RT-PCR	42
2.2.3	Proteine: Molekularbiologische und biochemische Methoden	43
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>SDS-PAGE</i>)	43
2.2.3.2	Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitro- zellulosemembranen (<i>Western Blot</i>)	43
2.2.3.3	Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293-Zellen	44
2.2.3.4	Behandlung von Proteinextrakten mit Endoglykosidasen	45
2.2.4	Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden	45
2.2.4.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	45
2.2.4.2	Transfektion von HEK293-Zellen mit FuGENE 6	46
2.2.4.3	Immunzytochemie und Mikroskopie	46
2.2.4.4	Kultivierung und Transfektion von HEK293 für Calcium-Imaging	47
2.2.4.5	Calcium-Imaging im heterologen Expressionssystem	48
2.2.5	Arbeiten mit Hefe	49
2.2.5.1	Eingesetzte Selektionsmarker	49
2.2.5.2	Transformation von Hefezellen	50
2.2.5.3	β -Galaktosidase-Test	51
3	ERGEBNISSE	53
3.1	Untersuchungen der N-Glykosylierungsstellen am N-Terminus des rTas1r2 und rTas1r3	53
3.1.1	Herstellung der Rezeptormutanten	53
3.1.2	Deglykosylierung des rTas1r2 und rTas1r3 mit Endoglykosidasen	56
3.1.3	Einfluss der Glykosylierung des Süßgeschmacksrezeptors auf seine Dimerisierung	61
3.1.4	Einführung einer zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle im rTas1r3 an der Position N 58	68
3.1.5	Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors	70
3.1.6	Intrazelluläre Lokalisierung der Rezeptoren rTas1r2, rTas1r3 und ihrer C-terminal verkürzten Mutanten	72
3.1.7	Ko-Immunpräzipitation des Süßgeschmacksrezeptors aus einer den Rezeptor stabil exprimierenden Zell-Linie mit Marker-Proteinen	77
3.1.8	Funktionelle Untersuchungen an den Mutanten des rTas1r2 und rTas1r3 im FLIPR	80
3.2	Identifizierung und Charakterisierung eines potentiellen Interaktionspartners der C- terminalen Domäne des rTas1r1 und rTas1r2	84
3.2.1	Auswertung des Hefe Zwei-Hybrid Screens	84

3.2.2	Überprüfung der Spezifität der Bindung und Identifizierung der die Bindung vermittelnden Domäne des rFhl-2	84
3.2.3	Expressionsanalyse des rFhl-2 in sensorischen Geweben und anderen Organen der Ratte mittels RT-PCR	88
3.2.4	Ko-Immunpräzipitation der C-terminalen Domänen von rTas1r1, rTas1r2, rTas1r3 mit rFhl-2 aus HEK293 Zellen	89
3.2.5	Ko-Immunpräzipitation von rFhl-2 mit dem Süßgeschmacksrezeptor	92
3.2.6	Ko-Expression von rTas1r2 und rTas1r3 mit rFhl-2 in HEK293 Zellen	94
4	DISKUSSION	98
4.1	Einfluss der N-Glykosylierung auf den Süßgeschmacksrezeptor	98
4.2	Heterodimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors	103
4.3	Intrazelluläre Lokalisierung und Transport des Süßgeschmacksrezeptors zur Zelloberfläche	108
4.4	Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung, Funktionalität und Lokalisierung des Süßgeschmacksrezeptors	111
4.5	rFhl-2, ein möglicher neuer Interaktionspartner des rTas1r1 und rTas1r2	114
4.5.1	Überprüfung der Spezifität der Bindung und Identifizierung der die Bindung vermittelnden Domäne des FHL-2	116
4.5.2	Ko-Expression und Ko-Lokalisation des potentiellen Interaktionspartners rFhl-2	117
5	ZUSAMMENFASSUNG	121
6	SUMMARY	123
7	LITERATURVERZEICHNIS	125
8	ANHANG	137
8.1	Vorhersage der potentiellen N-Glykosylierungsstellen des Süßgeschmacksrezeptors	137
8.2	Sequenzen von rTas1r2 und rTas1r3	139
8.2.1	Sequenz von rTas1r2	139
8.2.2	Sequenz von rTas1r3	141
8.3	Sequenz von rFhl-2	143
8.4	Ein- und Dreibuchstabenkode der Aminosäuren	144
8.5	Gefahrstoffverzeichnis	145

Abkürzungen

AC	Adenylat-Zyklase
Acc.	Zugangsnummer der GenBank-Datenbank
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
AT ₁ -Rezeptor	Angiotensin II Rezeptor Subtyp I
β-Gal	β-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BiP/GRP78	<i>immunoglobulin heavy chain binding protein, glucose-regulated protein (grp 78)</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium <i>sensing</i> -Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CRL-Rezeptor	<i>calcitonin receptor-like receptor</i>
CV	circumvallate Papille
cDNA	<i>complementary DNA</i>
DAG	Diazylglyzerol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
DRAL	<i>down-regulated in rhabdomyosarcomas LIM domain protein</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	extrazelluläre Schleife
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ENaC	<i>epithelial sodium channel</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum
FLIPR	Fluorescence Imaging Plate Reader
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GABA _B -Rezeptoren	<i>γ-aminobutyric acid_B receptor</i>
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GS	Geschmacksstreifen
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde
H ⁺	Protonen
HCN	<i>hyperpolarization activated cation channel</i>
HEK293	Human embryonic kidney 293
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	<i>Horsereadish Peroxidase</i> , Meerrettich Peroxidase
ICL	intrazelluläre Schleife
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K ⁺	Kaliumionen

Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria Bertoni
M	Molar, Mol/Liter
MDEG1	<i>mammalian degenerin channel 1</i>
mGluR	metabotrope Glutamatrezeptoren
Min	Minute
mRNA	messenger RNA
Na ⁺	Natriumionen
NC	Nitrozellulose
nt	Nukleotide
OD 600	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Protein Kinase C
PKD	<i>polycystic-kidney-disease</i>
PkdL	<i>polycystic-kidney-disease-like ion channel</i>
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RAMP	<i>receptor activity modifying proteins</i>
REEP	<i>receptor expressing enhancing proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolution per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RTP	<i>receptor transporting proteins</i>
rTas1r	Ratten Geschmacksrezeptor 1 (<i>rat taste 1 receptor</i>)
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SLIM3	<i>skeletal muscle LIM-protein 3</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	Trispuffer (Tris buffered saline)
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid
TM	Transmembran
TMD	Transmembrandomäne
TMR	Transmembranregion
TRP-Ionenkanal	<i>transient receptor potential channel</i>
u	Enzymeinheiten (units)
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VFTM	Venus-Fliegenfallen-Modul (<i>venus-fly-trap-module</i>)
Vol	Volumen
V2R	Pheromonrezeptoren
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Schreibweisen

Aus Gründen der Übersichtlichkeit, insbesondere bei der Aufzählung rationaler Zahlen, wird in der gesamten Arbeit statt des Dezimalkommas der anglo-amerikanische Dezimalpunkt verwendet.

Gen-Bezeichnungen der Maus und Ratte wurden kursiv und kleingeschrieben. Die humanen Proteine wurden in Grossbuchstaben und mit dem Vorsatz h gekennzeichnet, während die Proteine von Maus und Ratte nur die Anfangsbuchstaben in Grossbuchstaben erhielten und mit den Vorsätzen m bzw. r versehen wurden.

1 Einleitung

Geschmack und Geruch sind charakteristische Eigenschaften der Nahrung. Geschmacks- und Geruchssinneszellen sind Chemosensoren, die durch Geschmacks- und Geruchsstoffe gereizt werden und diese Reize an afferente Nervenfasern weiterleiten. Üblicherweise wird vom Geschmack der Nahrung gesprochen, obwohl bei der Aufnahme von Lebensmitteln ein Gesamteindruck verschiedener Empfindungen entsteht. Daran sind nicht nur der Geschmacks- und der Geruchssinn beteiligt, sondern auch Schmerzempfindungen, die durch „Schärfe“ verschiedener Gewürze hervorgerufen werden, die Temperatur der Nahrung, die mittels Thermosensoren wahrgenommen wird, und deren Konsistenzempfindung, die durch Druckrezeptoren vermittelt wird. Es werden fünf verschiedene Geschmacksmodalitäten unterschieden: sauer, salzig, bitter, süß und umami (Geschmack von Na-Glutamat). Über diese verschiedenen Geschmacksmodalitäten kann nahrhafte und gesunde Nahrung von schädlicher und gesundheitsgefährdender Nahrung unterschieden werden, wobei salzig, süß oder umami schmeckende Verbindungen als potentiell gesunde Nahrungsmittel und bitter und sauer schmeckende Verbindungen als potentiell gesundheitsschädliche Nahrungsmittel bewertet werden.

1.1 Wahrnehmung der verschiedenen Geschmacksmodalitäten

Die Geschmackswahrnehmung erfolgt über Geschmackspapillen, die auf der Zungenoberfläche und auf dem Gaumensegel lokalisiert sind. Es werden drei verschiedene Geschmackspapillen hinsichtlich ihrer Form und Verteilung unterschieden. Foliate Papillen (Blattpapillen) befinden sich an den seitlichen Rändern der Zunge, fungiforme Papillen (Pilzpapillen) liegen auf der Zungenspitze und die circumvallaten Papillen sind auf dem Zungengrund lokalisiert (Abbildung 1 A). Die Geschmacksknospen, die aus schalenartig angeordneten Geschmackssinneszellen bestehen, befinden sich in den Geschmackspapillen. Die Geschmackssinneszellen gehören zu den polaren Zellen, deren apikale Seite durch Mikrovilli vergrößert ist. Diese Zellfortsätze ragen aus der Pore, die durch

das Zungenepithel gebildet wird, heraus. Vermutlich gelangen die Geschmacksmoleküle (anorganische Ionen, Kohlenhydrate und weitere komplexe Moleküle) durch Diffusion in die Pore und in den Bereich, in denen die Geschmacksrezeptoren und Ionenkanäle lokalisiert sind (Lindemann 1996, 2001; Rehner & Daniel, 2002).

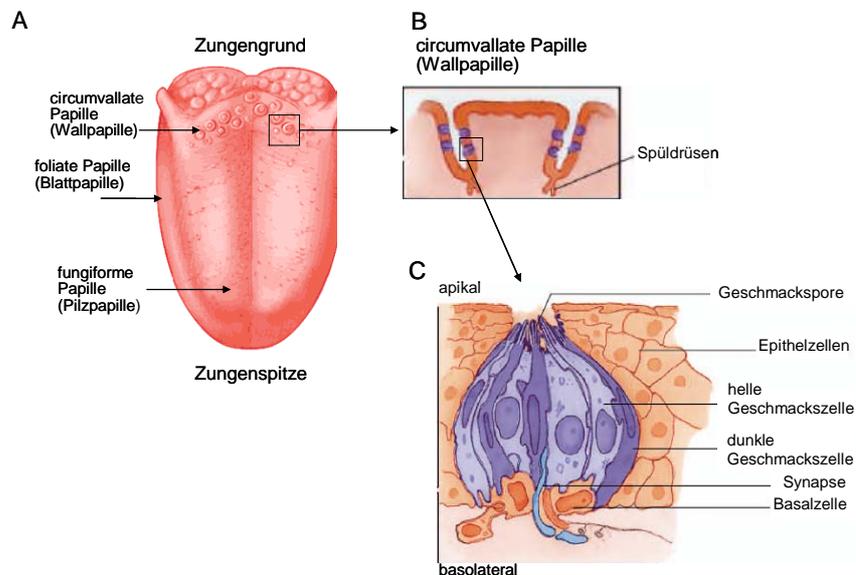


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Geschmacksepithels der Ratte.

A: Schematischer Aufbau der Rattenzunge mit den darauf befindlichen Geschmackspapillen B: Aufbau einer circumvallaten Papille, mit den in ihr vorhandenen Geschmacksknospen C: Aufbau einer Geschmacksknospe, mit den apikalen Mikrovilli und basolateralen Synapsen sowie den afferenten Nervenfasern (aus A: www.morphonix.com; B,C: Thieme Lehrbuch Physiologie, 2005).

Am unteren Pol der Geschmackspore befinden sich zwischen den Geschmackssinneszellen, die bei Säugern keine primären Nervenzellen sind, afferente Nervenfasern, die mit den Sinneszellen Synapsen ausbilden. Hierüber sind die Geschmackssinneszellen in der Lage, nach Aktivierung durch Liganden und Änderung ihrer elektrischen Ladungsverhältnisse Neurotransmitter an ihrer basolateralen Seite freizusetzen. Diese afferenten Nervenfasern nehmen die neuronalen Botenstoffe auf und leiten sie, als elektrische Signale umgewandelt, zum Geschmackszentrum im Gehirn weiter (Herness & Gilbertson, 1999).

Die Hauptaufgabe des gustatorischen Systems ist es, nahrhafte, gesunde und schädliche, gesundheitsgefährdende Nahrung zu differenzieren. Hierzu müssen die Geschmacksrezeptoren viele verschiedene chemische Verbindungen wie Ionen (Na^+ und H^+) und komplexe Moleküle (bitter und süßschmeckende

Substanzen) unterscheiden. Die aufgenommenen chemischen Signale müssen in differenzierte zelluläre Signale umgewandelt werden. Dies geschieht über die Veränderung des Membranpotentials, über die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} oder die Freisetzung von Serotonin oder ATP in den synaptischen Spalt, wobei die Einzelheiten für die einzelnen Geschmacksmodalitäten noch nicht bekannt sind (Lindemann, 1996).

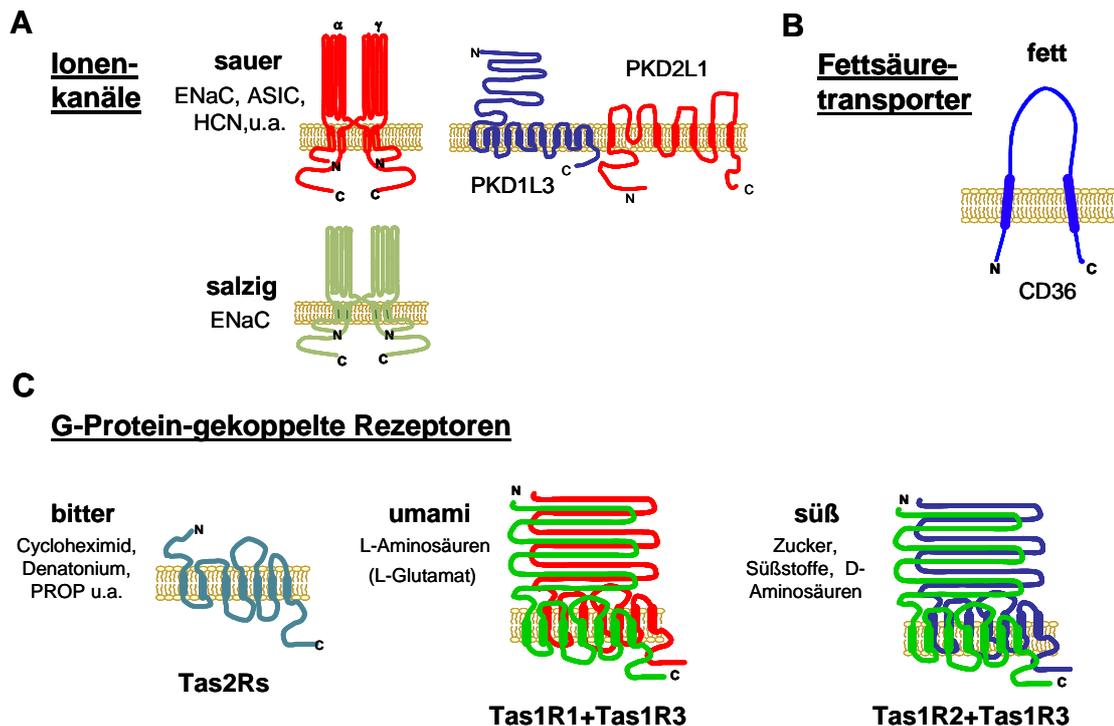


Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Geschmacksrezeptoren.

A: Die Geschmacksqualitäten sauer und salzig werden über Ionenkanäle vermittelt (Abbildung nach Lindemann, 1996 und Ishimaru et al., 2006). B: Der Geschmack für fett wird mittels eines Fettsäuretransporters wahrgenommen (C; Herness & Gilbertson, 1999; Abbildung nach Abumrad, 2005). C: Die Wahrnehmung von bitter, umami und süß erfolgt durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Abbildung nach Lindemann, 1996).

In Abbildung 2 sind die Geschmacksrezeptoren in ihrer Membrantopologie dargestellt. Der Geschmack von sauer und salzig wird durch Ionenkanäle für die Ionen Na^+ , K^+ und H^+ übermittelt. Hier erfolgt die Weitergabe des Signals über eine Depolarisation der Zelle, bei der nach Ca^{2+} -Einstrom neuronale Botenstoffe freigesetzt werden. Die Geschmacksqualitäten bitter, süß und umami werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wahrgenommen. Der Bittergeschmack wird über Rezeptoren der Tas2R-Familie und süß und umami werden über die Rezeptoren der Tas1R-Familie weitergeleitet. Die Mechanismen sind komplexer

und werden über G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion eingeleitet, die in einer Freisetzung von Neurotransmitter resultiert.

Zu diesen fünf in der Literatur akzeptierten Geschmacksmodalitäten sauer, salzig, bitter, süß und umami, wird ein weiterer Geschmacksrezeptor für den Fettgeschmack postuliert (Gilbertson et al., 1997; Herness & Gilbertson, 1999). Als Rezeptor wird CD36 (*cluster of differentiation 36*) diskutiert. Dieses Protein gehört zu den Fettsäuretransportern und wird auf der apikalen Seite der Geschmackssinneszellen hauptsächlich in den circumvallaten Papillen der Ratte exprimiert (Laugerette et al., 2005; Abumrad, 2005).

1.2 Molekulare Grundlagen des Geschmacks

1.2.1 Molekulare Grundlagen des Geschmacks für sauer und salzig

Die zwei Geschmacksrichtungen sauer und salzig werden über Ionenkanäle übermittelt. Der Geschmack für sauer dient als Warnung vor verdorbener Nahrung oder unreifen Früchten und verhindert deren Aufnahme, wodurch Folgen wie z. B. Gewebeschädigungen und Störungen des Säure-Basen-Haushaltes vermieden werden. Dabei wird ein schwach saurer Geschmack noch als angenehm wahrgenommen, während ein stark saurer Geschmack als widerlich empfunden wird (Lindemann, 1996; 2001). Die Aufnahme von salzigen Substanzen (wie Natriumchlorid und anderen Mineralien) dient der Regulation des Ionen- und Wasserhaushaltes eines Organismus.

Ionenkanäle werden durch Kationen wie Na^+ , K^+ und H^+ aktiviert. Der salzige Geschmack bei Nagern wird durch einen Amilorid-sensitiven Na^+ -Kanal der ENaC-Familie (*epithelial sodium channel*) übermittelt (Heck et al., 1984; Canessa et al., 1994). Ein entsprechender Ionenkanal konnte beim Menschen noch nicht identifiziert werden (Lindemann, 2001). Der saure Geschmack wird durch Protonen ausgelöst und bei Säugetieren nach bisheriger Auffassung durch zwei verschiedene Gruppen von Ionenkanälen ENaC und MDEG1 (*mammalian degenerin channel 1*) weitergeleitet. ENaC gehört zu der Gruppe von Ionenkanälen, die bei Anwesenheit von Protonen im Mundraum einen gerichteten Protonenfluss in der Sinneszelle auslösen. Dieser Ionenkanal reagiert außer auf Protonen auch auf Na^+ , wobei beide Ionen um die Bindungs-

stelle konkurrieren. Bei Spezies z. B. Ratte und Mensch mit einem hohen Anteil von Na^+ -Ionen im Speichel ist der Beitrag dieses Kanals zur Weiterleitung des sauren Geschmacks gering (Lyall et al., 2002; Gilbertson & Boughter, 2003). Zur zweiten Gruppe der Ionenkanäle, den unspezifisch H^+ -gesteuerten Kationen-Kanäle, gehören neben dem MDEG1, der HCN-Kationenkanal (*hyperpolarization-activated cation channel*) (Kinnamon et al., 1988; Ugawa et al., 1998; Miyamoto et al., 1998, 2000; Stevens et al., 2001). Bei beiden Geschmacksmodalitäten löst ein gerichteter Protonenfluss eine Depolarisation der Zelle aus und es erfolgt ein Einstrom von Ca^{2+} -Ionen, der zu einer Freisetzung von Neurotransmittern an der basolateralen Membran führt (Lindemann, 2001; Gilbertson & Boughter, 2003; Roper, 2003).

Neueste Erkenntnisse zeigen hingegen, dass der Geschmack für sauer über spezifisch in Geschmackszellen exprimierte TRP-Ionenkanäle (*transient receptor potential channel*) wahrgenommen wird. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass hier PKD1L3 (*polycystic-kidney-disease-1 like 3 ion channel*) und PKD2L1 (*polycystic-kidney-disease-2 like 1 ion channel*) als Heteromer in Geschmackszellen koexprimiert und durch verschiedene Säuren aktiviert werden können. Außerdem wurde berichtet, dass dieses Heteromer in anderen Geschmackszellen exprimiert wird als die Rezeptoren für bitter, süß und umami (LopezJimenez et al., 2006; Ishimaru et al., 2006; Huang et al., 2006). Weiter konnte durch Knockout-Mäuse für Pkd2l1 gezeigt werden, dass spezifisch die Wahrnehmung des sauren Geschmacks ausgeschaltet werden konnte, während die anderen Geschmacksmodalitäten nicht beeinflusst wurden (Huang et al., 2006).

1.2.2 Molekulare Grundlagen des Geschmacks für bitter, umami und süß

Der Geschmack für bitter, süß und umami wird über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) vermittelt. Die Rezeptoren für bitter (Matsunami et al., 2000; Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000), umami (Nelson et al., 2002; Li et al., 2001) und süß (Hoon et al., 1999; Nelson et al., 2001) wurden Anfang der Jahrtausendwende entdeckt.

Der Geschmack für bitter ist verbunden mit der potentiellen Warnung vor schädlichen Verbindungen z. B. Alkaloide und Toxine. Die Bitterrezeptoren gehören zu der Tas2R-Familie und diese wird bei Menschen und Nagern auf ca. 40-80 Mitglieder geschätzt, abzüglich der Pseudogene (Adler et al., 2000). Die Bitterrezeptoren besitzen untereinander eine Aminosäure-Identität von 30-70% (Adler et al., 2000) und gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit einer kurzen extrazellulären N-terminalen Domäne. In allen Geschmackszellen werden die Rezeptoren der Tas2R-Familie zusammen mit Gustducin, einem heterologen G-Protein, exprimiert (Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000). Durch die Rezeptoraktivierung interagiert die $\beta\gamma$ -Untereinheit des Gustducins mit der Phospholipase $C\beta_2$. Anschließend kommt es zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und zur Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Die Aktivierung einer geschmacksspezifischen Phosphodiesterase durch die α -Untereinheit des Gustducins führt zu einer Absenkung von zyklischen Nucleotiden (Margolskee, 2001). Manche amphiphile Bittersubstanzen können direkt mit Membran-gebundenen Ionenkanälen, Rezeptoren oder direkt mit G-Proteinen bzw. anderen Signalmolekülen interagieren (Lindemann, 1996; Gilbertson & Boughter, 2003).

Beim Menschen konnte ein Locus auf Chromosom fünf durch genetische Studien gefunden werden, der mit der Fähigkeit die Bittersubstanz PROP (6-n-propyl-2-thiouracil) schmecken zu können, verbunden ist (Reed et al., 1995). Durch Datenbank-Recherchen nach ähnlichen Rezeptoren konnten weitere Rezeptoren gefunden werden, die sich beim Menschen in Clustern auf Chromosom fünf, sieben und zwölf und bei der Maus auf Chromosom sechs und fünfzehn befinden. Die Loci *Soa*, *Rua*, *Cyx* und *Qui*, die sich im Bereich des Chromosoms sechs der Maus befinden, wurden schon in früheren Untersuchungen mit dem Geschmack für bitter in Verbindung gebracht (Warren & Lewis, 1970; Fuller et al., 1974). Durch Untersuchungen an verschiedenen Mauslinien, die sich in ihrer Sensitivität gegenüber verschiedenen Bittersubstanzen z.B. Cycloheximid unterscheiden („Schmecker“ und „Nicht-Schmecker“), konnte gezeigt werden, dass diese Differenzierung durch eine Mutation des *mTas2r5* Gens hervorgerufen wurde. Bestätigt wurde diese Beobachtung durch Untersuchungen im hetero-

logen System durch Ligandenvermittelte Rezeptoraktivierung (Chandrashekar et al., 2000).

Nicht mit den Bitterrezeptoren verwandt, sind die Rezeptoren der Tas1R-Familie, die den umami- bzw. Süßgeschmacksrezeptor bilden. Zu dieser Familie gehören die drei Mitglieder Tas1R1, Tas1R2 und Tas1R3. Diese Rezeptoren wurden unabhängig voneinander von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert. 1999 wurden von Hoon et al. die beiden „Waisen“-Rezeptoren Tas1r1 und Tas1r2 kloniert. Diese beiden Rezeptoren zeigen hinsichtlich ihrer Verteilung ein definiertes Expressionsmuster im Geschmacksgewebe von Nagetieren. Dabei wird Tas1r1 hauptsächlich in den fungiformen Papillen, im Geschmackstreifen und schwächer in den foliaten Papillen exprimiert. Tas1r2 wird im Gegensatz dazu hauptsächlich in den circumvallaten und foliaten Papillen, aber nur schwach im Geschmackstreifen exprimiert (Hoon et al., 1999). Etwa zeitgleich wurde das dritte Mitglied der Rezeptorfamilie Tas1r3 von Max et al. (2001), Montmayeur et al. (2001), Kitawaga et al. (2001) und Sainz et al. (2001) entdeckt. Schon früher konnte durch genetische Studien gezeigt werden, dass auf dem Maus-Chromosom vier ein Locus liegt, der *Sac-Locus*, der bei einigen Mausstämmen für die Empfindlichkeit gegenüber süßen Geschmacksstoffen wie Saccharin verantwortlich gemacht werden konnte (Fuller et al., 1974; Lush, 1989). Das Gen für den Rezeptor Tas1r3 liegt in dem *Sac-Locus*, und mehrere Polymorphismen sind für die unterschiedliche Sensibilität gegenüber Süßstoffen verantwortlich (Sainz et al., 2001; Nelson et al., 2001). Die Gene für Tas1R1 (*grp70*) und Tas1R2 (*grp71*) liegen auch auf dem distalen Bereich des Chromosoms vier der Maus, des Chromosoms fünf der Ratte und beim Menschen auf Chromosom eins (Li et al., 2001; Kitawaga et al., 2001; Montmayeur et al., 2001; Hoon et al., 1999).

Der Geschmack für umami (Na-Glutamat) wird durch das Heterodimer aus Tas1R1 und Tas1R3 gebildet und ist für die Wahrnehmung von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren von Bedeutung. Beim Menschen löst nur Na-Glutamat eine Signalweiterleitung dieses Rezeptors aus, während bei Nagetieren dieser Rezeptor auf L-Aminosäuren im allgemeinen reagiert. Eine charakteristische Eigenschaft dieser Geschmacksrichtung ist der geschmacksverstärkende Effekt

von 5'-Inosinmonophosphat und 5'-Guanosinmonophosphat (Kurihara & Kashiwayanagi, 1998; Maruyama et al., 2006). Außer dem Heterodimer aus Tas1R1 und Tas1R3 werden für den umami-Geschmack auch eine um 50% im N-terminalen Bereich verkürzte Variante des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR4, die in Geschmackszellen von Ratten exprimiert wird (Chaudhari et al., 2000), und eine N-terminal-deletierte Variante des metabotropen Glutamatrezeptors mGluR1, die auf einen Na-Glutamat-Stimulus in Zellkultur reagiert (San Gabriel et al., 2005), diskutiert. Detaillierte Untersuchungen der Signalweiterleitung stellen die verkürzte Variante des mGluR4 als umami Rezeptor in Frage (Zhao et al., 2003). Genetische Analysen von Tas1R-Rezeptoren in Mäusen verdeutlichen diese widersprüchliche Daten (Damak et al., 2003; Zhao et al., 2003). Zusammenfassend zeigen diese Erkenntnisse über den umami-Geschmack, dass Ergebnisse in nativen circumvallaten Geschmackszellen nicht nur mit einem einzigen dieser Rezeptoren (mGluR4, mGluR1 und Tas1R1+Tas1R3) für diese Geschmacksrichtung erklärt werden können und dass neue Wege für eine Beschreibung der Geschmacksrichtung umami eingeschlagen werden müssen (Maruyama et al., 2006).

1.3 Die Rezeptoren der Tas1R-Familie

Die Familie der Tas1R-Rezeptoren gehört aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu der Familie C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs). In diese Familie gehören auch die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs), die GABA_B-Rezeptoren (*γ-aminobutyric acid_B receptor*), die Pheromonrezeptoren (V2Rs), ein Aminosäurerezeptor (GPRC6A), der Calcium *sensing*-Rezeptor (CaSR) und zwei putative Rezeptoren mit denen die Tas1Rs eine etwa 30%ige Aminosäure-Identität aufweisen (Pin et al., 2003). Die Rezeptoren der Tas1R-Familie besitzen einen ca. 550 Aminosäure langen extrazellulären N-terminale Domäne, die in zwei Bereiche aufgeteilt werden kann - die Ligandenbindungsdomäne, die oft auch als Venus-Fliegenfallen-Modul (VFTM) bezeichnet wird (Parmentier et al., 2002; Bessis et al., 2002; Bockaert & Pin, 1999), und eine cysteinreiche Domäne, die eine Verbindung zwischen der Ligandenbindungsdomäne und der sieben Transmembranregion (7 TMR) schafft. Dieser

Rezeptorbereich umfasst ca. 80 Aminosäuren und enthält neun konservierte Cysteine. Die cysteinreiche Domäne fehlt bei den GABA_B-Rezeptoren und ist somit nicht für die Faltung und Funktion des Venus-Fliegenfallen-Moduls notwendig (Pin et al., 2003). Aufgrund von Kristallisationsstudien an der extrazellulären Domäne des mGluR1 und Sequenzähnlichkeiten mit dem bakteriellen periplasmatischen Leucin/Isoleucin/Valin-Bindungsprotein (LIV-BP) wurde der N-Terminus dieser Rezeptoren als Ligandenbindungsdomäne charakterisiert (Kunishima et al., 2000).

In neuesten Untersuchungen wurde inzwischen beschrieben, dass es für verschiedene süßschmeckende Liganden verschiedene Ligandenbindungstaschen im Venus-Fliegenfallen-Modul (VFTM) und in der sieben Transmembrandomäne (7 TMD) gibt. Süßschmeckende Proteine (Monellin, Brazzein) binden in der cysteinreichen Domäne von hTAS1R3 (Jiang et al., 2004). Durch Untersuchungen an Rezeptorchimären aus humanen und Nagergen, die die N-terminale Domäne der einen Spezies fusioniert an die 7 TMD und die C-terminale Domäne der zweiten Spezies tragen, konnte gezeigt werden, dass Aspartam und Neotam in der VFTM des Tas1R2 und Cyclamat dagegen in der extrazellulären Schleife 2 und 3 (ECL 2 und 3) der Untereinheit Tas1R3 bindet. Dies konnte durch zusätzliche Mutationsanalysen weiter eingegrenzt werden. Es wird angenommen, dass die Bindungstasche für Cyclamat aus den Transmembrandomänen drei, fünf und sechs und der extrazellulären Schleife 2 gebildet wird (Xu et al., 2004; Jiang et al., 2005). Außerdem wurde für den Antagonisten Lactisol, der den Süßgeschmack beim Menschen, aber nicht bei Nagern, inhibiert, eine Bindung in einer überlappenden, aber nicht identischen, Region des hTAS1R3 beschrieben (Jiang et al., 2004, 2005; Xu et al., 2004). Durch Mutationen des rTas1r3 konnte nachgewiesen werden, dass nur zwei Aminosäuren (V 738, L 735) in der Transmembrandomäne fünf für die Insensitivität gegenüber Lactisol verantwortlich sind (Winnig et al., 2005). $\beta\gamma$ in ein intrazelluläres Signal umgewandelt. Durch diese Untereinheiten können weitere Reaktionskaskaden in Gang gesetzt werden, die zur Bildung intrazellulärer Signalmoleküle führen.

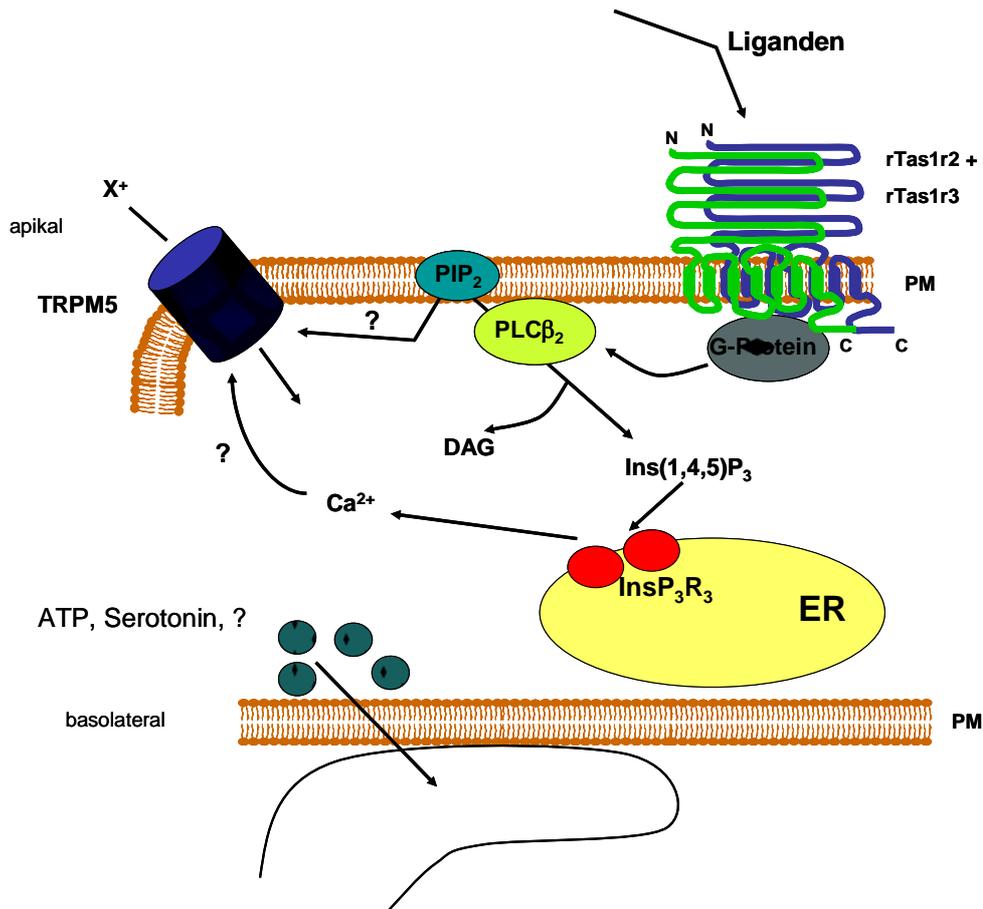


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Signalweges des Süßgeschmacks (gemeinsamer Signalweg, der auch für bitter und umami postuliert wird).

Nach Ligandenbindung an den Süßgeschmacksrezeptor (rTas1r2+rTas1r3) zerfällt ein trimeres G-Protein, das mit seiner α -Untereinheit die Phospholipase C β_2 (PLC β_2) aktiviert und zur Freisetzung von Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) führt. IP₃ führt zu einem Einstrom von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und einer Öffnung des TRPM5-Kanals.

Lange Zeit wurde über den Mechanismus der Signalweiterleitung bei den Geschmacksrichtungen süß, umami und bitter spekuliert. Für Bittersubstanzen, natürliche Zucker und synthetische Süßstoffe wurden verschiedene Signaltransduktionswege diskutiert (Margolskee, 2002). Neuere Untersuchungen zeigen einen gemeinsamen Signalweg für bitter, süß und umami, an dem die Phospholipase C β_2 (PLC β_2) und der TRPM5-Ionenkanal beteiligt sind. In Abbildung 3 ist der gemeinsame Signalweg für süß, umami und bitter dargestellt. Nach Aktivierung der Rezeptoren durch Ligandenbindung dissoziiert das trimere G-Protein in seine α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Nach Stimulation der PLC β_2 durch die G α_q -Untereinheit, entsteht durch Hydrolyse von PIP₂ aus der Plasmamembran DAG und IP₃. Durch IP₃ wird Ca²⁺ über den Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor 3

(IP₃R₃), einem Ionenkanal, aus intrazellulären Speichern freigesetzt (Margolskee, 2002; Miyoshi, 2001). Der Anstieg von Ca²⁺ im Zytosol oder eine indirekte Aktivierung über PLCβ₂ regt den TRPM5-Ionenkanal an, wodurch einwertige Kationen aus dem extrazellulären Raum einströmen. Die Öffnung dieses TRPM5 führt zu einer Depolarisation der Geschmackszelle und setzt Neurotransmitter frei (Perez et al., 2002, 2003; Zhang et al., 2003; Prawitt et al., 2003; Liu & Liman, 2003).

TRP-Ionenkanäle spielen auch in anderen, physiologisch unterschiedlichen Prozessen eine wichtige Rolle, z.B. im sensorischen System bei der Phototransduktion in *D. melanogaster* (Minke & Cook, 2002). Untersuchungen an Plcβ₂- und Trpm5-Knockout-Mäusen zeigen, dass die Gabe von süßen und bitteren Substanzen bzw. Aminosäuren keine induzierbaren Aktionspotentiale an den Geschmackshauptnerven (*Chorda tympani* und *Nervus glossopharyngeus*) auslöst, während nach Stimulation durch salzige oder saure Substanzen Aktionspotentiale bestimmt werden konnten (Zhang et al., 2003).

1.4 Hypothesen zur Kodierung der Geschmacksmodalitäten

Für die Kodierung der Geschmacksmodalitäten bitter, umami und süß stehen sich zwei verschiedene Hypothesen gegenüber: zum Einen die Möglichkeit, dass eine einzelne Geschmackssinneszelle mehrere Geschmacksmodalitäten wahrnehmen kann (Amrein & Bray, 2003; Caicedo et al., 2002; Gilbertson et al., 2001; Margolskee et al., 2002) und zum Anderen, dass eine Geschmackssinneszelle nur jeweils einen Rezeptor einer der Geschmacksrichtungen exprimiert (Zhang et al., 2003; Zhao et al., 2003).

In Abbildung 4 sind die beiden verschiedenen Hypothesen einander gegenübergestellt. Abbildung 4 A zeigt die Hypothese der Signalweiterleitung über eine Geschmackssinneszelle, die alle Rezeptortypen gleichzeitig exprimiert. Die Signalweiterleitung muss hier durch eine große Anzahl von Signalmolekülen über verschiedene Wege erfolgen (*across fiber model*). Somit muss die Geschmackssinneszelle die einzelnen Geschmacksrichtungen durch verschiedene sensorische Nerven entschlüsseln.

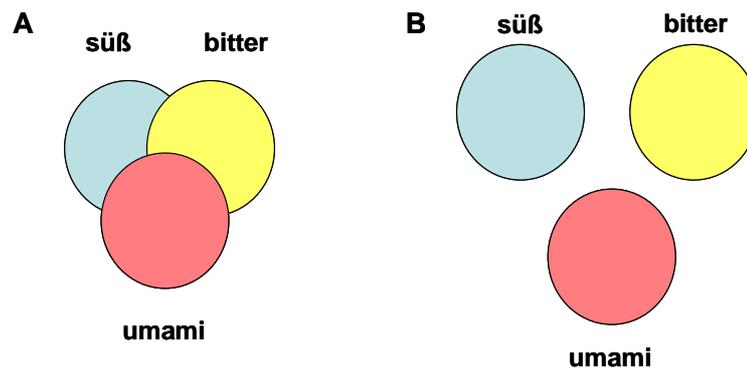


Abbildung 4: Zwei Hypothesen der Geschmacksweiterleitung.

A: Hier erfolgt die Signalweiterleitung ausgelöst durch eine große Zahl von Signalmolekülen in einer Geschmackssinneszelle über verschiedene Signalwege. Die Geschmacksrichtungen müssen durch verschiedene sensorische Nerven verschlüsselt werden (*across fibre model*). B: In dem olfaktorischen und vomeronasalen System wird die Weiterleitung des Signals über einen gemeinsamen Signaltransduktionsweg postuliert, wie es ähnliches auch für das gustatorische System angenommen wird (*labelled line model*).

Abbildung 4 B stellt die zweite Hypothese dar, bei der die Rezeptoren der Tas1R- und Tas2R-Familie in verschiedenen nicht überlappenden Zellen und Regionen exprimiert werden (Nelson et al., 2001; Adler et al., 2000; Hoon et al., 1999). Zahlreiche experimentelle Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Hypothese (*labelled line model*), die für das olfaktorische und vomeronasale System postuliert wird, auch im gustatorischen System gilt. Daraus lässt sich folgern, dass die Geschmackssinneszelle keine breite Spezifität besitzt. Ob das auch für die Kodierung des Geschmacks auf der Ebene der Nervenfasern (*labelled line model*) gilt, nämlich dass jeweils eine Nervenfaser nur eine Geschmackssinneszelle einer Geschmacksrichtung innerviert, oder ob die Kodierung des Geschmacks nach dem *mixed labelled model* weitergegeben wird, nämlich dass eine Nervenfaser Geschmackssinneszellen verschiedener Geschmacksrichtungen innerviert, muss noch näher untersucht werden (Zhang et al., 2003; Zhao et al., 2003).

1.5 Sekretorischer Weg

Um ihre Rolle als Rezeptoren für von außen einwirkende Geschmacks-substanzen erfüllen zu können, müssen die Rezeptoren effektiv in die Plasmamembran eingebaut werden.

Sekretorische und Plasmamembranproteine, zu denen auch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und im Golgi-Komplex modifiziert. Hierfür besitzen die sekretorischen Proteine, die Proteine der Plasmamembran und die Proteine des Endomembransystems (ER, Golgi-Komplex und Lysosomen) eine spezifische Zielsteuerungssequenz. Diese Zielsteuerungssequenz wird von dem SRP (*signal recognition particle*) erkannt und der Komplex aus wachsender Polypeptidkette, Ribosom und SRP, welches GTP gebunden hat, wandert zum ER. Nach Bindung von SRP-GTP an den SRP-Rezeptor und dem Ribosom am Translocon, wird das GTP zu GDP hydrolysiert. Anschließend diffundiert das SRP vom SRP-Rezeptor ab und die Proteinbiosynthese wird wieder aufgenommen (Schwartz & Blobel, 2003). Der Prozess der Proteintranslokation kann während (ko-translational) oder nach (post-translational) der Synthese an den Ribosomen stattfinden. Sekretorische Proteine und einige Membranproteine (Insulinrezeptor [IR], mGluR1), die ko-translational ins ER transloziert werden, besitzen eine spaltbare N-terminale ER-Signalsequenz. Diese ER-Signalsequenz besitzt keine Konsensus-Sequenz, sondern zeigt gemeinsame physikalisch-chemische Eigenschaften (Lodish et al., 2000; Keenan et al., 2001; Martoglio & Dobberstein, 1998). Diese ist für die Mitglieder der Familie Tas1R noch nicht experimentell nachgewiesen. Für einige extrazelluläre Domänen von Mitgliedern der Subfamilie C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass diese sich als sekretorische Proteine exprimieren lassen, u.a. der mGluR1, der mGluR4 und die GABA_B-Rezeptoren (Han & Hampson, 1999; Malitschek et al., 1999; Selkirk et al., 2002). Dies deutet auf das Vorhandensein einer N-terminalen Signalsequenz hin. Proteine mit mehreren Transmembrandomänen besitzen zusätzliche Sequenzen, die als Membranankersequenzen dienen (Lodish et al., 2000).

Nach Beendigung der Proteinbiosynthese werden die in die Membran des ER eingebauten bzw. die in das Lumen des ER überführten Proteine zu den jeweiligen Zielorten transportiert. Während dieses Prozesses werden die Polypeptide modifiziert. Die fünf wichtigsten Modifikationen sind: Bildung von Disulfidbrücken, korrekte Proteinfaltung, Anheftung und Modifikation von Kohlen-

hydratketten, spezifische proteolytische Spaltungen und Zusammenfügung von Proteinuntereinheiten zu multimeren Komplexen. Nach Abschluss der Synthese und der Modifikationen im Lumen oder der Membran des ER werden die meisten Proteine in kleine Transportvesikel verpackt, die mit dem *cis*-Golgi-Apparat verschmelzen. Der Golgi-Apparat besteht aus Stapeln abgeflachter und funktionell differenzierter Membranzisternen. In diesem Abschnitt des sekretorischen Weges finden weitere post-translationale Prozessierungsschritte statt, bevor die Proteine weiter sortiert werden und zu ihrem endgültigen Bestimmungsorten gelangen (Voet & Voet, 2002; Lodish et al., 2000).

1.5.1 N-verknüpfte Glykosylierung

Die Glykosylierung, insbesondere die N-Glykosylierung, ist wichtig für die korrekte Proteinfaltung, den intrazellulären Transport, die Sekretion und die Oberflächenexpression von Proteinen in der Zelle. Für verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCRs), z. B. des humanen Calcium *sensing*-Rezeptor (hCaSR), konnte ein Einfluss der N-Glykosylierung auf die Oberflächenexpression gezeigt werden (Ray et al., 1998). Bei anderen Rezeptoren, z. B. dem Rezeptor des Follikel-stimulierenden Hormons oder des Thyroid-stimulierenden Hormons, ist eine Kombination von verschiedenen Glykosylierungsstellen für die Oberflächenexpression notwendig (Nunez & Aragon, 1994). Der AT₁-Rezeptor (Angiotensin II Rezeptor Subtyp I) gehört auch zu den GPCRs und ist in verschiedene physiologische Prozesse, wie die Blutdruck-Regulation, involviert. In seinem N-Terminus besitzt er drei potentielle N-Glykosylierungspositionen. An seinem Beispiel konnte gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung wichtig für den Transport des Rezeptors zur Zellmembran ist und dass ein nicht-glykosylierter AT₁-Rezeptor zwar auch zur Zelloberfläche transportiert wird, aber stärker angereichert im ER vorliegt (Lanctot et al., 1999; 2005). GPCRs können nicht nur in der N-terminalen Domäne glykosyliert werden, sondern auch in den extrazellulären Schleifen (ECL) der 7 TMD. Weiterhin ist bekannt, dass sich das Verhalten von Wildtyprezeptoren von denen vollständig oder partiell nicht-glykosylierter Rezeptorformen, aber auch durch die Einführung zusätzlicher N-Glykosylierungspositionen, durch ihre Neigung zur Aggregatbildung unterscheiden kann (Lanctot et al., 2005).

Die Glykosylierungsreaktionen beginnen im ER-Lumen und werden im Golgi-Apparat noch weiter modifiziert. Es werden N-glykosidisch (an Asparaginresten) oder O-glykosidisch (an Serin- und Threoninresten) angefügte Zuckerketten unterschieden. N-Glykosylierung entsteht durch die Anheftung einer vorgefertigten an das Membranlipid Dolichol gebundenen Kohlenhydratkette an den Amid-Stickstoff des Asparagins der Konsensus-Sequenz Asn-X-Thr/Ser. Sie sind länger als O-Glykosylierungen und in der Regel verzweigt. Die für die N-Glykosylierung eingesetzten Oligosaccharide gehören zu einem bestimmten Typ: Sie bestehen aus N-Acetylglukosamin, Mannose und Glukose, enthalten insgesamt 14 Zuckerreste und werden *en bloc* angeheftet (Abbildung 5).

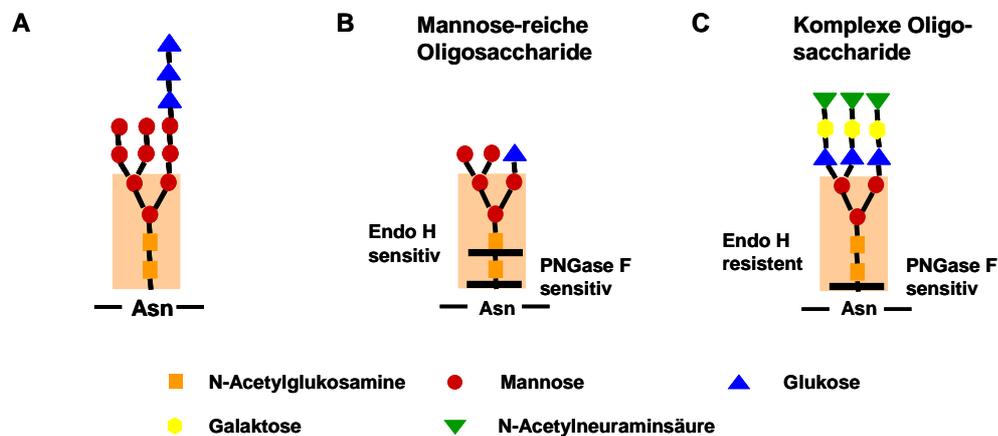


Abbildung 5: Aufbau Asparagin-verknüpfter Oligosaccharide und ihre Prozessierung

A: Aufbau eines Asparagin-verknüpften Oligosaccharids, das im rauen ER *en-bloc* angeheftet wird. Es besteht aus zwei N-Acetylglukosaminen, neun Mannoseresten und drei Glukoseresten. Die Kernstruktur ist orange unterlegt. B: Mannosereiche Oligosaccharide sind gegenüber der Endoglykosidase Endo H sensitiv und entstehen durch die Abspaltung von drei Glukoseresten und einem Mannoserest durch die beiden Glukosidasen I und II. C: Komplexe Oligosaccharide sind Endo H resistent, können aber durch die Endoglykosidase PNGase F geschnitten werden und entstehen nach weiterer Prozessierung im Golgi-Apparat.

Direkt im Anschluss werden durch die Glukosidasen I und II die ersten drei Glukosereste und ein Mannoserest abgespalten. Danach gelangen die Glykoproteine über Transportvesikel in den Golgi-Apparat und werden dort durch das Anheften zusätzlicher Zuckerreste weiter modifiziert. Die Enzyme, die diese Prozessierung durchführen, sind charakteristisch für die einzelnen Golgi-Kompartimente (*cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi-Zisternen). Durch die vielfältigen Modifikationen, die Kohlenhydratketten im Laufe ihrer Prozessierung im ER und

im Golgi-Apparat erfahren, können mannosereiche oder komplex glykosylierte Formen eines Proteins unterschieden werden. Bei mannosereichen glykosylierten Proteinen handelt es sich um die Form, die sich im ER befindet und hauptsächlich Mannosereste enthält. Auf diese Form wird durch die UDP-Glukose:Glykoprotein-Glukosyltransferase (UGGT) ein Glukoserest übertragen, wenn die Proteine falsch oder nicht korrekt gefaltet sind. Dieser Vorgang ist entscheidend für die Qualitätskontrolle des ER. Im Golgi-Komplex entstehen dann durch Abspaltung und erneute Anheftung unterschiedlicher Zuckerreste (N-Acetylglukosamin, Galaktose, Fukose, N-Acetylglukosaminsäure) die komplexen Oligosaccharidketten (Helenius & Aebi, 2004). Um die mannosereichen und die komplexen Kohlenhydratketten an einem Protein voneinander unterscheiden zu können, werden zwei verschiedene Endoglykosidasen eingesetzt. Nach Abspaltung bestimmter Mannosereste durch Mannosidasen im Golgi-Komplex bleibt eine Kernstruktur (Abbildung 5, orange unterlegte Struktur) zurück, die man in allen komplexen Oligosacchariden findet. Durch Entfernung der äußeren Mannosereste wird die Bindung zwischen den N-Acetylglukosaminresten stabil gegenüber der Endoglykosidase Endo H. Weitere komplexe Strukturen, die sich aus dieser ableiten, sind ebenfalls resistent gegenüber der Endoglykosidase H. Aus diesem Grund setzt man dieses Enzym ein, um zwischen mannosereichen und komplexen Oligosacchariden zu unterscheiden. Eine weitere Endoglykosidase, die PNGase F (*peptide-N-glycosidase F*), schneidet alle Zuckerketten ab, da sie in der Lage ist die Bindung zwischen dem Asparagin und den beiden N-Acetylglukosaminresten zu hydrolysieren. Mit diesem Enzym kann die Zahl der N-verknüpften Oligosaccharidketten abgeschätzt werden (Nunez & Aragon, 1994).

1.5.2 Molekulare Chaperone und Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum

Werden Proteine auf dem sekretorischen Weg nicht richtig gefaltet und zusammengesetzt, werden sie vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytosol zurücktransportiert und dort durch das Proteasom abgebaut (Hurtley & Helenius, 1989; Plember & Wolf, 1999). An dieser Qualitätskontrolle des ERs sind verschiedene Proteine beteiligt, die so genannten molekularen Chaperone,

die sich vorübergehend an die entstehende Polypeptidkette oder partiell gefaltete Zwischenprodukte binden und falsche Faltung, Aggregation und Zusammenlagerung verhindern (Lehrman, 2001).

Die wichtigsten ER-Chaperone sind BiP/GRP78, Calnexin und Calreticulin. Beim BiP/GRP78 handelt es sich um ein Protein aus der 70 kDa-Hitzeschock-Proteinfamilie (HSP 70-Familie) mit einem Molekulargewicht von 78 kDa. BiP/GRP78 wurde ursprünglich in unabhängigen Arbeitsgruppen als *immunoglobulin heavy chain binding protein* (Haas & Wabl, 1983; Morrisson & Scharff, 1975) und *glucose-regulated protein (grp 78)* (Pouysinger & Yamada, 1978) beschrieben. Calnexin und Calreticulin sind an der Qualitätskontrolle des ER beteiligt und überprüfen die Faltung der Proteine (Hammond et al., 1994; Hammond & Helenius, 1994; Helenius et al., 1994). Calnexin ist dabei ein integrales Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa, während Calreticulin mit einem Molekulargewicht von 90 kDa ein lösliches ER-Protein ist. Aufgrund ihrer transienten Bindung an neu synthetisierte Glykoproteine, wurden zunächst beide als molekulare Chaperone, beschrieben. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass es sich um ER-Lektine handelt (Ware et al., 1995; Spiro et al., 1996), für deren Bindung an die Glykoproteine die Struktur der Kohlenhydratseitenketten von Bedeutung ist (Vassilkos et al., 1998; Ware et al., 1995).

Wie in Abschnitt 1.5.1 beschrieben, werden die Proteine durch das Anhängen einer bestimmten, vorgefertigten Oligosaccharidkette N-glykosyliert und durch die beiden Glukosidasen I und II im ER-Lumen modifiziert. Die monoglukosylierte Form des Proteins wird durch die beiden Lektine Calnexin und Calreticulin gebunden. Die Proteindisulfidisomerase ERp57, die in einem Komplex mit Calnexin und Calreticulin vorliegt, sorgt für die Ausbildung nativer Disulfidbrücken (Oliver et al., 1997; 1999). Die Glukosidase II spaltet anschließend den letzten Glukoserest ab, und das Glykoprotein wird freigegeben. Dies wird auch als Calnexin/Calreticulin-Zyklus bezeichnet (Ellgaard et al., 1999; Ellgaard & Helenius, 2003). UDP-Glukose: Glykoprotein-Glukosyltransferase (UGGT) gehört auch zum Qualitätskontrollsystem des ER und dient als Faltungssensor (Hammond & Helenius, 1994). Dieses Enzym bindet spezifisch an

Proteindomänen mit nicht korrekter Konformation (Ritter & Helenius, 2000) und reglukosyliert das dissoziierte Protein, so dass es erneut durch Calnexin und Calreticulin gebunden wird. Glykoproteine können mehrere solcher Faltungszyklen durchlaufen, bis sie entweder korrekt gefaltet sind oder in das Zytosol gelangen und nach Ubiquitinylierung vom Proteasom degradiert werden (Plember & Wolf, 1999).

1.6 C-terminal interagierende Proteine und ihre funktionelle Rolle bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Nach erfolgreicher Modifizierung sind Protein-Protein-Interaktionen für den weiteren Transport und die Funktion sensorischer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) notwendig. GPCRs gehören zu der großen Gruppe der sieben Transmembranproteine mit einer extrazellulären N-terminalen Domäne, einer zytoplasmatischen C-terminalen Domäne und sieben Transmembrandomänen, die durch drei intrazelluläre Schleifen (ICL) und drei extrazelluläre Schleifen (ECL) miteinander verbunden sind. Die Vielfältigkeit und Spezifität ihrer Signalwege wird zusätzlich durch eine Vielzahl von interagierenden Proteinen reguliert. Außerdem brauchen diese Rezeptoren weitere Proteine, die mit ihren Transmembrandomänen oder der C-terminalen Domäne interagieren (Hall & Lefkowitz, 2002). Hierzu zählen Chaperone, Gerüstproteine und weitere Effektormoleküle in der Signaltransduktion.

Neben den G-Proteinen, die mit intrazellulären Bereichen des Rezeptors interagieren und ihn mit den intrazellulären Signaltransduktionswegen verbinden, gibt es noch weitere Proteine, die die post-translationale Modifizierung und Sortierung des Rezeptors steuern. Hierfür können als Beispiel RAMP1-3 (*receptor activating modifying protein*), RTP1-4 (*receptor transporting protein*) oder REEP1-6 (*receptor expressing enhancing protein*) genannt werden. RAMP1 und RAMP2 interagieren mit dem CRL-Rezeptor (*calcitonin receptor-like*), einem sieben Transmembranprotein mit einer 55%igen Identität zum Calcitoninrezeptor (Njuki et al., 1993). RAMP1 und RAMP2 steuern außer dem Transport auch die Glykosylierung des Rezeptors und sein pharmakologisches Profil (McLatchie et al., 1998). Auch beim Calcium *sensing*-Rezeptor (CaSR) über-

nehmen RAMPs eine wichtige Rolle. Hier sind RAMP1 und RAMP3 wichtig für die Oberflächenexpression und RAMP3 außerdem für die Glykosylierung (Bouschet et al., 2005). Mitglieder der RTP-Familie (RTP1, RTP2) zeigen einen Einfluss auf die funktionelle Expression von olfaktorischen Rezeptoren (ORs). Sie sind wichtig für die Rezeptorfaltung und den Rezeptortransport (Saito et al., 2004). Es konnte inzwischen auch gezeigt werden, dass Bitterrezeptoren (hTAS2R16) mit Mitgliedern der RTP- und REEP-Genfamilie interagieren (Behrens et al., 2006).

Die Vielfältigkeit der Proteine, die mit der C-terminalen Domäne interagieren, ist groß. Sie wirken z. B. auf die intrazelluläre Signaltransduktion über die Modifizierung der GTPase-Aktivität (Ross & Wilkie, 2000), auf die nachgeschaltete Signalweiterleitung, durch Bildung sehr großer Proteinkomplexe, die die einzelnen Teile einer Signalkaskade in räumliche Nähe bringen (Gerüstproteine, *scaffolding proteins*) oder auch auf die Vernetzung unterschiedlicher Signaltransduktionswege (Ausbildung eines Signalosoms).

Diese sogenannten Gerüstproteine bestehen meist aus mehreren konservierten Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die die Signalmoleküle in räumliche Nähe bringen und somit ein Signalosom bilden. Solche Protein-Protein-Interaktionsdomänen sind SH2 (*scr homology 2*), SH3, PTB (*phosphotyrosine binding*) und PDZ (*postsynaptic-density-95/Dics-large/ZO1*) und in der Literatur vielfältig beschrieben (Bockaert, 2003; Pawson & Nash, 2003). Eine weitere solche Interaktionsdomäne, die als Adaptor oder Gerüstprotein die Bildung eines Signalosoms unterstützen kann, ist die LIM-Domäne (Bach, 2000; Kadramas & Beckerle, 2004).

Die LIM-Domäne ist ein cysteinereiches Sequenzmotiv, das in einer Vielzahl von Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen, von Transkriptionsfaktoren über Protoonkogene bishin zu Komponenten des Zytoskeletts, gefunden wurde. Der Name leitet sich von den zwei *C. elegans* Genen *lin-11* und *mec-3* und dem Nagetier-Gen *Isf-1* ab (Dawid et al., 1998; Jurata & Gill, 1998; Kadramas & Beckerle, 2004). LIM-Proteine kommen in allen Eukaryonten, aber nicht in Prokaryonten vor. Jede LIM-Domäne (siehe Abbildung 6) besteht aus zwei tandemartig angeordneten Zinkfinger-Motiven und koordiniert zwei Zink-Ionen in

tetraedrischer Umgebung über die hochkonservierten Cystein- und Histidinreste (Dawid et al., 1998; Jurata & Gill, 1998; Kadramas & Beckerle, 2004).

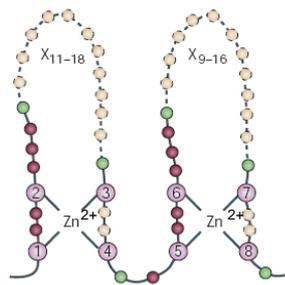


Abbildung 6: Topologie der LIM-Domäne.

Dargestellt ist die Topologie der Zn^{2+} -Koordination. In rosa Kreisen sind die koordinierenden Zn^{2+} -bindenden Reste dargestellt. Nicht-konservierte aliphatische/sperrige Reste sind in grün, nicht-konservierte Reste mit unveränderlichen Abständen sind in magenta abgebildet. Gelbe Kreise stellen eine variable Anzahl von Resten (X) dar (entnommen aus Kadramas & Beckerle, 2004).

Die LIM-Domäne als Strukturmotiv ist an einer Vielzahl von regulatorischen Prozessen in der Zelle beteiligt. Es wurden LIM-Proteine identifiziert, die entweder im Kern oder im Zytoplasma lokalisiert sind, aber auch solche, die in beiden Kompartimenten gefunden werden (Bach, 2000). Aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologien werden LIM-Domänen in die vier Klassen A-D eingeteilt. Die LIM-Domänen-Proteine werden aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten einer von vier Gruppen zugeordnet. Es werden LIM/Homeodomänen Proteine (hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren), LIM-Kinasen, LIM-Proteine mit anderen funktionellen Domänen und LIM-only Proteine unterschieden (Dawid et al., 1998). LIM-Proteine zeigen keine intrinsische katalytische Aktivität, aber sie vermitteln viele biologische Prozesse über die Bindung an Zielproteine. LIM-Domänen können als Adaptoren, Kompetitoren, Autoinhibitoren oder Gerüstproteine dienen (Kadramas & Beckerle, 2004).

Das in dieser Arbeit untersuchte LIM-Protein FHL-2 (*four and a half LIM-2*), spielt bei vielen Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle. Es sind bis heute mehr als 50 Proteine bekannt, die mit FHL-2 interagieren, wobei die biologische Rolle noch unklar ist. FHL-2 spielt z. B. bei der Herz-Entwicklung und -Physiologie, aber auch bei der Muskelentwicklung eine große Rolle (Chu et al.,

2000; Kong et al., 2001; Martin et al., 2002). Durch seine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Transkriptionsfaktor GATA-1 deutet sich eine mögliche Rolle als Transkriptionsfaktor an, obwohl eine direkte Bindung an DNA noch nicht nachgewiesen werden konnte. Der Androgen-Rezeptor (AR) ist der erste beschriebene Transkriptionsfaktor, dessen transkriptionelle Aktivität durch FHL-2 stimuliert wird (Müller et al., 2000). FHL-2/CBP/p300 und β -Catenin verstärken synergistisch ligandenaktivierte AR-medierte Transkription, wenn der Androgen-Rezeptor auf niedrigem Niveau transkribiert wird (Labalette et al., 2004). Außerdem spielen LIM-Proteine auch eine Rolle bei verschiedenen Signaltransduktionswegen, wobei sie eine Aufgabe als Gerüstproteine (Hic-5, Paxillin, PINCH und Zyxin) übernehmen können (Johannessen et al., 2006).

1.7 Zielsetzung

Verschiedene experimentelle Untersuchungen des Süßgeschmacksrezeptors (rTas1r2 und rTas1r3) haben gezeigt, dass er nur als Heterodimer funktionell ist, welches jedoch nur schlecht an die Zelloberfläche transportiert wird. Von anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) der Subfamilie C ist bekannt, dass für den Prozess der Dimerisierung verschiedene Bereiche der Rezeptoren (N- und C-terminale Domäne, 7 Transmembrandomäne) essentiell sind. Zusätzlich ist bekannt, dass die N-Glykosylierung bei GPCRs seinen Transport zur Zelloberfläche, seine Funktionalität und seine Dimerisierung beeinflussen kann. In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Einfluss der N-Glykosylierung mittels gerichteter Mutagenese einzelner N-Glykosylierungsstellen auf die Dimerisierung und Funktionalität des Süßgeschmacksrezeptors untersucht werden. Durch Deletion der C-terminalen Domäne von rTas1r2 und rTas1r3 sollte sein Einfluss auf die Dimerisierung und Funktionalität nachgewiesen werden. In weiteren Experimenten sollte außerdem die intrazelluläre Lokalisierung des Rezeptors mithilfe verschiedener Markerproteine für das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat festgestellt werden.

Um neue Interaktionspartner für die C-terminalen Domänen der rTas1r-Familie zu finden, wurde in der Diplomarbeit von Gabriel Frank ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen durchgeführt. Dabei konnte das *four and a half* LIM-Protein

(FHL-2) als ein Protein identifiziert werden, dass mit den C-terminalen Domänen von rTas1r1 und rTas1r2 interagiert. Da von FHL-2 schon zuvor bekannt war, dass es viele verschiedene Protein-Protein-Interaktionen vermittelt, sollte in einem weiteren Teil dieser Arbeit die Interaktion von rFhl-2 mit der C-terminalen Domäne des rTas1r1 und rTas1r2 näher charakterisiert werden. Die Domäne, die die Interaktion vermittelt, sollte im Hefe-System näher eingegrenzt werden und anschließend im heterologen Expressionssystem bestätigt werden.

Diese Arbeit sollte einen Beitrag zur Aufklärung des Einflusses der N-Glykosylierung und der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung, den Transport und die Funktion des Süßgeschmacksrezeptors leisten und helfen neue mögliche intrazelluläre Interaktionspartner für die C-terminale Domäne der Tas1R-Familie zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Firmenverzeichnis

Abcam Limited, Cambridgeshire, UK
Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Heidelberg
BioRad Laboratories GmbH, München
Biother GmbH, Kelkheim/Ts.
Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg
Dianova GmbH, Hamburg
Difco (Clontech Laboratories GmbH), Heidelberg
Dynal GmbH, Hamburg
Eppendorf GmbH, Hamburg
Fluka, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gibco (Invitrogen Life Technologies), Karlsruhe
Grünenthal, Aachen
Hefa Pharma, Werne
Invitrogen Life Technologies (Invitrogen Corporation), Karlsruhe
Jackson Immuno Research, West Grove, USA, über Dianova GmbH, Hamburg
Marchery & Nagel GmbH & Co KG, Düren
MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
Merck Bioscience, Darmstadt
Millipore GmbH, Eschborn
Molecular Probes Europe BV, Leiden, NL
New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Ts.
Novagen, Schwalbach
Pierce, Bonn
Promega GmbH, Mannheim
Q-Biogene, Heidelberg
Qiagen GmbH, Hilden
Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Santa Cruz Biotechnologie Inc, Heidelberg
Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Serva, Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Stratagene Europe, Amsterdam, NL

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht aufgeführt sind, wurden von Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) in p.A. Qualität bezogen.

Acrylamid	Roth
Adenin-Hemisulfat	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ampicillin	Grünenthal
Aprotinin	Fluka
Bacto-Agar	Difco
Bacto-Pepton	Difco
Bromphenolblau	Merck
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's Modified Eagels Medium)	Sigma-Aldrich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich
DNA-Marker	Fermentas
DOB	Q Biogene
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
ECL (Enhanced Chemiluminescence)	Roche
FCS (Fötales Kälberserum)	Sigma-Aldrich
FuGENE 6	Roche
Geneticin G 418	Gibco
Hefe-Extrakt	Difco
Heringsspermien-DNA	Clontech
Hygromycin	Invitrogen
Igepal	Sigma-Aldrich
Kanamycin	Serva
L-Glutamin	Gibco
Leupeptin	Fluka
Lipofektamine 2000	Invitrogen
Lithiumacetat	Sigma-Aldrich
ONPG (o-Nitrophenylgalaktosid)	Sigma-Aldrich
PEG 3350	Sigma-Aldrich
Pepstatin A	Fluka
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	Fluka

Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich
Rainbow Molecular Weight Marker Full Range	Amersham Pharmacia Biotech
Super Signal West Femto	Pierce
Temed	Sigma-Aldrich
Triton® X-100	Sigma-Aldrich
Tween-20	Sigma-Aldrich
YPD	Q-Biogene

2.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Fermentas, New England Biolabs, Roche, Invitrogen Life Technologies, MBI
Taq-Polymerase	Qiagen
Pfu-Polymerase	Stratagene
Endoglykosidasen	New England Biolabs
Endo H	
PNGase F	
CIP-Phosphatase	New England Biolabs
T4-Ligase	Invitrogen
Trypsin	Invitrogen

2.1.4 Antikörper

Die folgenden primären und sekundären Antikörper sowie Immunreagenzien wurden in dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 2-1: Übersicht über die eingesetzten Antikörper.

Angegeben sind die Bezeichnungen, der Verwendungszweck mit eingesetzter Verdünnung und die Herkunft der Antikörper einschließlich Referenz bzw. Bestellnummer. WB: Western Blot; ICC: Immunzytochemie.

Antikörper	Verwendung (eing. Verdünnung)	Herkunft
α -GFP (polyklonal)	WB (1:10000)	Abcam (ab 6556)
α -FLAG M2 (monoklonal)	WB (1:1000)	Stratagene (200472)
α -FLAG (polyklonal)	ICC (1:1000)	Sigma-Aldrich (F 7425)
α -FLAG M2 Affinity Gel	IP	Sigma-Aldrich (F2426)
α -HSV (monoklonal)	WB/ICC (1:10000)	Novagen (69171-4)
α -T7 (monoklonal)	WB/ICC (1:10000)	Novagen (69522-3)

Antikörper	Verwendung (eing. Verdünnung)	Herkunft
α -myc (monoklonal)	WB (1:1000)	Sigma-Aldrich (M 4439)
α -myc (polyklonal)	ICC (1:1000)	Santa Cruz (sc-789-G)
α -PDI (monoklonal)	WB/ICC (1:250)	BD Clontech (610946)
α -GM 130 (monoklonal)	WB/ICC (1:250)	BD Clontech (610822)
α -Calnexin (monoklonal)	WB (1:1000) ICC (1:500)	BD Clontech (610523)
α -Calreticulin (monoklonal)	WB (1:2500) ICC (1:500)	BD Clontech (612136)
α -BiP/GRP 78 (monoklonal)	WB (1:250)	BD Clontech (610978)
α -Hsp 70 (monoklonal)	WB/ICC (1:1000)	BD Clontech (610607)
α -rTRX (polyklonal)	WB (1:1000)	gegen den C-Terminus von rTRX gerichtet (SHSTATNPRPGNKT, AS 877-891)
α -Maus-HRP	WB (1:5000)	Amersham (NA 9310)
α -Kaninchen-HRP	WB (1:10000)	Dianova (111-035-144)
α -Maus Alexa Fluor488	ICC (1:1000)	Molecular Probes (A-11029)
α -Kaninchen Alexa Fluor488	ICC (1:1000)	Molecular Probes (A-11034)
α -Maus Cy3	ICC (1:500)	Dianova (115-165-062)
α -Kaninchen Cy3	ICC (1:500)	Dianova (711-166-152)
Maus IgG		Sigma-Aldrich (I 5381)

2.1.5 Nukleotidsequenzen und GenBank-Zugriffsnummern

In der folgenden Tabelle sind die GenBank-Zugriffsnummern für cDNA Nukleotidsequenzen aufgeführt, die zur Plasmidkonstruktion eingesetzt wurden. Auf die Gen-Datenbank wurde über die Internetadresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> zugegriffen.

Tabelle 2-2: Angegeben sind die in dieser Arbeit eingesetzten Sequenzen, die Spezies und die GenBank-Zugriffsnummer.

Sequenz	Spezies	GenBank-Nummer
Tas1r1	Ratte	AF127389
Tas1r2	Ratte	AF127390
Tas1r3	Ratte	AF456324
Trx/Gprc6a	Ratte	AJ535460
Fhl-2	Ratte	NM031677
Fhl-1	Maus	BC031120

2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von dem Service-Labor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (IZKN, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf, UKE) mit einem DNA/RNA-Synthesizer (Applied Biosystems) hergestellt. Durch eine Ethanol-fällung wurden diese von zusätzlichen Salzen befreit und auf eine Konzentration von 10 pmol/µl in H₂O eingestellt. Weitere Oligonukleotide wurden bei der Firma MWG BIOTECH AG über die Internetadresse www.mwg-biotech.com bestellt. Diese Oligonukleotide wurden mit ddH₂O auf die Endkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Alle zur PCR und Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide sind in 5´-3´-Richtung in der folgenden Tabelle aufgelistet. Zusätzlich angefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen dargestellt.

Tabelle 2-2: Übersicht über die eingesetzten Oligonukleotide.

Angegeben sind die Namen der Oligonukleotide, ihre Sequenz, enthaltene Schnittstellen sowie der Verwendungszweck. F und R nach dem Namen geben die Richtungen forward (f) und reverse (r) an. Start- und Stop-Codons sind fett markiert, Schnittstellen unterstrichen. Mit einem „*“ versehene Oligonukleotide sind von der Firma MWG Biotech AG. Die nt-Angaben beziehen sich auf die jeweilige codierende Sequenz.

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA Sequenzierung	
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG Sequenzierung	
pcDNA3.1 rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG Sequenzierung	

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
EGFP, C f	GTC CTG CTG GAG TTCG Sequenzierung	
EGFP, C r	CAG GGG GAG GTG TGG Sequenzierung	
rTas1r2 mut 87 f	GGA GGA GAT CAA CCA GTG TAG CTC CCT GCT Mutagenese	
rTas1r2 mut 87 r	AGC AGG GAG CTA CAC TGG TTG ATC TCC TCC Mutagenese	
rTas1r2 mut 296 f	GGT GCT CCG CTG GCA GTT CAC GGG TTT TGT Mutagenese	
rTas1r2 mut 296 r	ACA AAA CCC GTG AAC TGC CAG CGG AGC ACC Mutagenese	
rTas1r2 mut 316 f	CCC AGT TCT GCA TCA GCT CAC GGA GCT GCG Mutagenese	
rTas1r2 mut 316 r	CGC AGC TCC GTG AGC TGA TGC AGA ACT GGG Mutagenese	
rTas1r2 mut 355 f	GTA TCC CGT GCC TCA GAC GAC CAA CCT GCG Mutagenese	
rTas1r2 mut 355 r	CGC AGG TTG GTC GTC TGA GGC ACG GGA TAC Mutagenese	
rTas1r2 mut 372 f	TGA CGC CTG CTT GCA GAC CAC CAA GTC CTT Mutagenese	
rTas1r2 mut 372 r	AAG GAC TTG GTG GTC TGC AAG CAG GCG TCA Mutagenese	
rTas1r2 mut 432 f	GAT CTG GCA CGT CCA GTT CAC GCT CCT GGG Mutagenese	
rTas1r2 mut 432 r	CCC AGG AGC GTG AAC TGG ACG TGC CAG ATC Mutagenese	
rTas1r2 mut 484 f	AAC CTA CAT TAA CCA GGT GTC CTG GTA CAC Mutagenese	
rTas1r2 mut 484 r	GTG TAC CAG GAC ACC TGG TTA ATG TAG GTT Mutagenese	
rTas1r2 mut 491 f	CTG GTA CAC CCC CCA GAA CAC GGT CCCTGT Mutagenese	
rTas1r2 mut 491 r	ACA GGG ACC GTG TTC TGG GGG GTG TAC CAG Mutagenese	
rTas1r2 mut 531 f	AGG CAC CTA CCT CCA GCG CTC AGC AGA TGA Mutagenese	
rTas1r2 mut 531 r	TCA TCT GCT GAG CGC TGG AGG TAG GTG CCT Mutagenese	

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
rTas1r2 A	CAT ACA GCG CCA TCT CCG AC Sequenzierung	
rTas1r2 B	CTG CGG ACG ACG ACC TGC AAC C Sequenzierung	
rTas1r2 ex f	CAG ATA TCA <u>CCA TGG</u> GTC CCC AGG CAA GG Amplifizierung und Klonierung	<i>EcoRI</i>
rTas1r2ΔC r	GCA TGC <u>GGC CGA</u> GGT GTT GCG CTC Amplifizierung und Klonierung	<i>NotI</i>
rTas1r3 mut +58 f	CAC AGC CCA ACG GCA GCC TAT GTA CCA GGT Mutagenese	
rTas1r3 mut +58 r	ACC TGG TAC ATA GGC TGC CGT TGG GCT GTG Mutagenese	
rTas1r3 mut 85 f	AGA GGA GAT CAA CCA GGG ATC TGC CTT GCT Mutagenese	
rTas1r3 mut 85 r	AGC AAG GCA GAT CCC TGG TTG ATC TCC TCT Mutagenese	
rTas1r3 mut 130 f	TGC TGC CTA CTG CCA GTA CAC ACA GTA CCA Mutagenese	
rTas1r3 mut 130 r	TGG TAC TCT GTG TAC TGG CAG TAG GCA GCA Mutagenese	
rTas1r3 mut 203 f	GAC ACT GTT GCA GCA GTT CAG CTG GAA CTG Mutagenese	
rTas1r3 mut 203 r	CAG TTC CAG CTG AAC TGC TGC AAC AGT GTC Mutagenese	
rTas1r3 mut 264 f	GCT ACG CCA AGT GCA GCA AAG CAA AGT ACA Mutagenese	
rTas1r3 mut 264 r	TGT ACT TTG CTT TGC TGC ACT TGG CGT AGC Mutagenese	
rTas1r3 mut 379 f	CAT CAT GCT ACA GCA GCT GTC ATC TGG GCT Mutagenese	
rTas1r3 mut 379 r	AGC CCA GAT GAC AGC TGC TGT AGC ATG ATG Mutagenese	
rTas1r3 mut 387 f	TGG GCT GAT GCA GCA GCT ATC AGC TGG GCA Mutagenese	
rTas1r3 mut 387 r	TGC CCA GCT GAT AGC TGC TGC ATC AGC CCA Mutagenese	
rTas1r3 mut 418 f	CAC CCT GCA GTG CCA GGT CTC ACA TTG CCA Mutagenese	
rTas1r3 mut 418 r	TGG CAA TGT GAG ACC TGG CAC TGC AGG GTG Mutagenese	

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
rTas1r3 mut 439 f	GGA GAA CATGTA CCA GAT GAG TTT CCG TGC Mutagenese	
rTas1r3 mut 439 r	GCA CGG AAA CTC ATC TGGTAC ATG TTC TCC Mutagenese	
rTas1r3 mut 482 f	TGT AGG CAC CTT CCA GGG CAC CCT TCA GCT Mutagenese	
rTas1r3 mut 482 r	AGC TGA AGG CAC GGC AAC AAG GTG CCT ACA Mutagenese	
rTas1r3 A	CGT GTG CTG GCT GTC ATT GG Sequenzierung	
rTas1r3 B	AGT GAG TCC TGG CTG ACC TC Sequenzierung	
rTas1r3 C	ACT GTA GGC ACC TTC AAC GG Sequenzierung	
rTas1r3 ex f	CAG ATA TCA <u>CCA TGG</u> CGG GTT TGG CTA TC Amplifizierung und Klonierung	<i>EcoRI</i>
rTas1r3ΔC r	GCA TGC <u>GGC CGC</u> CGG TGT TGA GCT C Amplifizierung und Klonierung	<i>NotI</i>
rTas1R1 7TM * f	GCA <u>TAA GCT TGA</u> GCT TCA CAT CTG CCA G Amplifizierung und Klonierung	<i>HindIII</i>
rTas1r2 7TM * f	GCA <u>TAA GCT TGA</u> TGA GTT TAA CTG TCT G Amplifizierung und Klonierung	<i>HindIII</i>
rTas1r3 7TM * f	GCA <u>TAA GCT TGA</u> TGA CTT CAC CTG TAC T Amplifizierung und Klonierung	<i>HindIII</i>
TR1B,r	GAT <u>GGA TCC TCA</u> GGT AGT GCC GCA GCG CCT C Amplifizierung und Klonierung	<i>BamHI</i>
TR2B,r	GAT <u>GGA TCC TCA</u> GCT CTT CCT CAT GGT GTA Amplifizierung und Klonierung	<i>BamHI</i>
T1R3,R	AAT <u>GGA TCC TCA</u> TTC ACT GTG TCC CCG AGT TG Amplifizierung und Klonierung	<i>BamHI</i>
rFhl-2 1f	GCA TAT GAC TGA ACG CTT TGA CTG C Amplifizierung und Klonierung	<i>NdeI</i>
rFhl-2 2r neu	<u>TGG ATC CTC</u> AGA TGT CCT TTC CAC AGT C Amplifizierung und Klonierung	<i>BamHI</i>
rFhl-2 3r	<u>TGG ATC CTC</u> AGC AGG TCA GGC AGT ATG G Amplifizierung und Klonierung	<i>BamHI</i>
rFhl-2 4f	<u>GCA TAT GTG</u> TGT GCA GTG CAA AAA GC Amplifizierung und Klonierung	<i>NdeI</i>
rFhl-2 5r	<u>TGG ATC CTC</u> AAT AGC AGT CGG TGC ACA GCA G Amplifizierung und Klonierung	<i>BamHI</i>

Bezeichnung	Sequenz	Schnittstelle
rFhl-2 6f	<u>GCA TAT GTG</u> CCA GGA GTG TAA GAA GAC Amplifizierung und Klonierung	<i>NdeI</i>
rFhl-2 * f	GCA <u>TAA GCT TAT</u> GAC TGA ACG CTT TG Amplifizierung und Klonierung	<i>HindIII</i>
rLIM 2-3 * f	GCA <u>TAA GCT TAT</u> GTG CCA GGA GTG T Amplifizierung und Klonierung	<i>HindIII</i>
rLIM 3-4 * f	GCA <u>TAA GCT TAT</u> GTG TGT GCA GTG C Amplifizierung und Klonierung	<i>HindIII</i>
rhFHL-2, f	TGC CAG GTA CCC GCA AGA TG RT-PCR-Untersuchungen	
rhFHL-2, r	CTT ACA GTT AAA GCA GTC GTT RT-PCR-Untersuchungen	
rhHGPRT f	CGT CGT GAT TAG TGA TGA TG RT-PCR-Untersuchungen	
rhHGPRT2r, r	TTC AAA TCC AAC AAA GTC TGG C RT-PCR-Untersuchungen	

2.1.7 Zur Verfügung gestellte Plasmide

Verwendete Plasmide anderer Arbeitsgruppen oder kommerziell erhältliche Vektoren, die zur Konstruktion neuer Plasmide eingesetzt wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2-4: Übersicht über die zur Verfügung gestellten Plasmide und Vektoren.

Aufgelistet sind die Bezeichnung, die Herkunft und der Verwendungszweck.

Ausgangsvektor	Herkunft	Beschreibung
pGBKT7	Clontech	Köder-Plasmid im Hefe Zwei-Hybrid-System mit GAL4 DNA-Bindungsdomäne
pGADT7	Clontech	Bibliotheksplasmid im Hefe Zwei-Hybrid-System mit GAL4 Aktivierungsdomäne
pEGFP-C1, C3	Clontech	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-terminalen Grün-fluoreszierenden Protein (EGFP, enhanced green fluorescent protein) in eukaryontischen Zellen
pcDNA3	Invitrogen	Expression von Fusionsproteinen in eukaryontischen Zellen

Ausgangsvektor	Herkunft	Beschreibung
pcDNA3.1 mycHIS A	Invitrogen	Expression von Fusionsproteinen mit dem C-terminalen myc-Peptid-tag (EQKLISEEDL) in eukaryontischen Zellen
pCDNA3 T7-Ntag		Roth et al. (1997), Expression von Fusionsproteinen mit dem N-terminalen T7-Peptid-tag (MASMTG GQQMG) in eukaryontischen Zellen
pCR-BluntII-TOPO	Invitrogen	Klonierung von Pfu-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten
rTas1r2-HSV-pcDNA3	Nicole Burhenne (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie)	Eukaryontischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins des rTas1r2 mit einem C-terminalen HSV-Epitop.
rTas1r3-3xFLAG-pcDNA3	Nicole Burhenne (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie)	Eukaryontischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins des rTas1r3 mit einem C-terminalen 3xFLAG-Epitop (DYKDDDD KDKDDDDKDYKDDDDK).
rTRX-HSV-pcDNA3	Nicole Burhenne (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie)	Eukaryontischer Vektor zur Expression eines Fusionsproteins des rTRX mit einem C-terminalen HSV-Epitop.

2.1.8 Konstruierte Plasmide

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit konstruierten bzw. verwendeten eukaryontischen Expressionsplasmide zusammengefasst.

Tabelle 2-5: Konstruierte Plasmide.

Aufgelistet sind die Bezeichnung, der enthaltene Sequenzbereich, wobei sich die nt-Angaben auf die codierende Sequenz beziehen, und der Verwendungszweck.

Bezeichnung	Sequenzbereich	Verwendungszweck
rTas1r2 WT-HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N87Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N296Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N316Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N355Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen

Bezeichnung	Sequenzbereich	Verwendungszweck
rTas1r2 _{N372Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N432Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N484Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N491Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 _{N531Q} -HSV pcDNA3	nt 1-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 Δ C pcDNA3	nt 1-2481	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r2 Δ C-HSV pcDNA3	nt 1-2481	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 WT-3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 ₊₅₈ -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen, Einführung einer zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle
rTas1r3 _{N85Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N130Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N203Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N264Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N379Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N387Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N439Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 _{N482Q} -3xFLAG pcDNA3	nt 1-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 Δ C pcDNA3	nt 1-2493	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1r3 Δ C-3xFLAG pcDNA3	nt 1-2493	Expression in eukaryontischen Zellen
rTas1R1ct-pGBKT7	rTas1R1 nt 2426-2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rTas1r2ct-pGBKT7	rTas1r2 nt 2441-2532	Hefe Zwei-Hybrid-System
rTas1r3ct-pGBKT7	rTas1r3 nt 2454-2577	Hefe Zwei-Hybrid-System
rTas1R1ct-pGADT7	rTas1R1 nt 2426-2523	Hefe Zwei-Hybrid-System

Bezeichnung	Sequenzbereich	Verwendungszweck
rTas1r2ct-pGADT7	rTas1r2 nt 2441-2532	Hefe Zwei-Hybrid-System
rTas1r3ct-pGADT7	rTas1r3 nt 2454-2577	Hefe Zwei-Hybrid-System
rFhl-2-pGBKT7	rFhl-2 nt 1-840	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim ½-1-pGBKT7	rFhl-2 nt 1-279	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim ½-3-pGBKT7	rFhl-2 nt 1-636	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim 2-3-pGBKT7	rFhl-2 nt 301-636	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim 3-4-pGBKT7	rFhl-2 nt 484-840	Hefe Zwei-Hybrid-System
mFhl-1-pGBKT7	mFhl-1 nt 1-842	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim ½-1-pGADT7	rFhl-2 nt 1-279	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim ½-3-pGADT7	rFhl-2 nt 1-636	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim 2-3-pGADT7	rFhl-2 nt 301-636	Hefe Zwei-Hybrid-System
rLim 3-4-pGADT7	rFhl-2 nt 484-840	Hefe Zwei-Hybrid-System
mFhl-1-pGADT7	mFhl-1 nt 1-842	Hefe Zwei-Hybrid-System
GFP rTas1R1ct-pEGFP	rTas1R1 nt 2428-2523	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rTas1r2ct-pEGFP	rTas1r2 nt 2443-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rTas1r3ct-pEGFP	rTas1r3 nt 2454-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rTas1R1 7 TM-pEGFP	rTas1R1 nt 1591-2523	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rTas1r2 7 TM-pEGFP	rTas1r2 nt 1603-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rTas1r3 7 TM-pEGFP	rTas1r3 nt 1615-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
T7 rTas1R1 7 TM-pcDNA 3	rTas1R1 nt 1591-2523	Expression in eukaryontischen Zellen
T7 rTas1r2 7 TM-pcDNA 3	rTas1r2 nt 1603-2532	Expression in eukaryontischen Zellen
T7 rTas1r3 7 TM-pcDNA 3	rTas1r3 nt 1615-2577	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rFhl-2-pEGFP	rFhl-2 nt 1-840	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rLim ½-1-pEGFP	rFhl-2 nt 1-279	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rLim ½-3-pEGFP	rFhl-2 nt 1-636	Expression in eukaryontischen Zellen
GFP rLim 3-4-pEGFP	rFhl-2 nt 484-840	Expression in eukaryontischen Zellen
T7 rFhl-2- pcDNA 3	rFhl-2 nt 1-840	Expression in eukaryontischen Zellen

Bezeichnung	Sequenzbereich	Verwendungszweck
T7 rLim 1/2-1-pcDNA 3	rFhl-2 nt 1-279	Expression in eukaryontischen Zellen
T7 rLim 1/2-3-pcDNA 3	rFhl-2 nt 1-636	Expression in eukaryontischen Zellen
T7 rLim 3-4-pcDNA 3	rFhl-2 nt 484-840	Expression in eukaryontischen Zellen

2.1.9 Zell-Linien, Bakterien - und Hefestämme

Zell-Linien:

HEK293 (Human Embryonic Kidney)	DMSZ Nr.: ACC 305
Z41 (rTas1r2/rTas1r3)	Winnig, M. (DIfE)
HEK293T $G_{\alpha.16}$ gust44	Ueda, T. et al., 2003

Bakterienstämme:

TOP F 10	Invitrogen, Karlsruhe
XL-Blue	Stratagene, Amsterdam

Hefestämme:

Für Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe Zwei-Hybrid-System wurden die Hefestämme AH109 und Y187 (BD Clontech, Heidelberg), die die Reportergene HIS3, ADE2 und lacZ unter der Kontrolle des GAL4-Promoters tragen, verwendet.

AH109:	MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, MEL1:: GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2 URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ
Y187:	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-807, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , mef, gal80 Δ , URA3::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -lacZ, MEL1

2.1.10 Geräte

Agarosegelkammern	Blue Marine (Serva)
Blot-Apparatur	Semidry (Merck Darmstadt)
CO ₂ -Inkubator	APT Line CB 210, (Binder Tuttlingen)
DNA-Sequenzierer	DNA Sequencer 377 (Applied Biosystems Weiterstadt)
DNA-Synthesizer	DNA Synthesizer 394 (Applied Biosystems Weiterstadt)
Elektrophoresekammer	BioRad, München, Mini-Protean III System
Geldokumentationsanlage	Geldokumentation BDA Digital mit Dunkelhaube, Kamera Canon Power Shot G3 und Software BioDoc Analyze (Biometra GmbH, Göttingen)
Heizblock	Thermomixer compact (Eppendorf Hamburg)
Kühlzentrifugen	SIGMA 6K15, (Osterode)
Mikroskope	LSM 510 Meta (Carl Zeiss Oberkochen)
Netzgeräte	(BioRad München)
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	BioPhotometer (Eppendorf Hamburg), Spektrophotometer SmartSpecTM3000 (BioRad München)
Sterilbank	Hera Safe (Heraeus, Hanau)
Thermozykler	Mastercycler Gradient (Eppendorf Hamburg); GeneAmp PCR System (Perkin Elmer Weiterstadt)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D, Centrifuge 5417R (Eppendorf Hamburg)
UV-Tisch	Herolab, Wiesloch, UVT 28 M
Wasserbäder	GFL, Burgwedel, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 DNA: Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR; *polymerase chain reaction*)

Die Amplifizierung gewünschter DNA erfolgte durch den *PCR-Cycler* Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer) bzw. Mastercycler Gradient (Eppendorf), wobei die PCR-Ansätze auf Eis pipettiert wurden. Für die präparative PCR betrug das Reaktionsvolumen 50 µl. Ein Standardansatz sah wie folgt aus:

50-100 ng	cDNA Matrize
10 pmol	je Starter-Oligonukleotid
200 µM	dNTPs (je 50 µM)
2-5 u	<i>PfuTurbo</i> [®] DNA Polymerase
5 µl	10x <i>Pfu</i> -Puffer
ad 50 µl	ddH ₂ O

Für die analytische PCR wurde der *Taq QIAGEN MasterMix* in einem Reaktionsvolumen von 25 µl den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Das im Folgenden wiedergegebene PCR-Standardprogramm variierte in Abhängigkeit der Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotide, der Länge des erwarteten PCR-Produktes und der Menge an Matrize.

Standardprogramm:

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Schritte
Prädenaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	25 - 35 Zyklen
Oligonukleotid-Anlagerung	55-65°C	30 s	
Polymerase Reaktion	72°C	30 s – 4 min	
abschl. Polymerase Reaktion	72°C	7 – 10 min	1

Die PCR-Produkte wurden in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel isoliert (Kapitel 2.2.1.4), mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen (Kapitel 2.2.1.5) geschnitten und in geeignete Vektoren kloniert. Die resultierenden Klone wurden mittels Hydrolyse mittels Restriktionsendo-

nukleasen (Kapitel 2.2.1.5) und Sequenzierung (Kapitel 2.2.1.10) auf ihre Richtigkeit überprüft.

2.2.1.2 Gerichtete Mutagenese über PCR

Es fand die von Wang (Wang & Malcolm, 1999) modifizierte, auf dem QuikChange™ Mutagenese Protokoll von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) basierende Mutagenese-Anwendung. Dabei wurden Mutagenese-Oligonukleotide eingesetzt, die die entsprechende Mutation tragen. Als Matrize diente ein Plasmid mit der zu mutierenden cDNA. Zur späteren Eliminierung der Matrizen-Plasmide mussten diese methyliert sein. Dies wurde durch Vervielfältigung in *dam*⁺ *E. coli*-Zellen (dazu gehören die meisten kommerziell erhältlichen Stämme, z. B. TOP10F['], XL-Blue) erreicht (Das *dam* Gen codiert eine Methyltransferase, die Adenin in der Zielsequenz GATC an Position N6 methyliert [Urig, 2002]). Es wurde die komplette Plasmid-DNA in der PCR amplifiziert, so dass ein anschließender Klonierungsschritt des PCR-Produktes in ein Plasmid nicht nötig war. Parentale (methylierte) Plasmide wurden durch Hydrolyse mittels der Restriktionsendonuklease *DpnI* eliminiert (*DpnI* ist eine Restriktionsendonuklease, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA schneidet [Zielsequenz: 5'Gm⁶ATC-3']). Anschließend wurden *E. coli* (TOP10F[']) Zellen mit dem Mutageneseansatz transformiert. Die Ligation der aufgeschnittenen Vektoren erfolgte in den Bakterienzellen.

Der Unterschied zum QuikChange™ Mutagenese Protokoll von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bestand darin, zunächst in getrennten Ansätzen je einen Strang der Plasmide durch Einsatz jeweils nur eines Oligonukleotids (entweder vorwärts oder rückwärts) zu amplifizieren. Es entstanden so Hybrid-Plasmide aus einem parentalen Strang ohne Mutation und einem neu synthetisierten Strang, der bereits die Mutation trug. Nach der Vereinigung der getrennten Ansätze standen die Hybrid-Plasmide als Matrize zur Verfügung. Die Hybridisierung der Oligonukleotide wurde so erleichtert, da diese an die Region der Hybrid-Plasmide banden, in der bereits die gewünschten Mutationen vorlagen. Die QuikChange™ Mutagenese wurde in je einem 25 µL Ansatz pro Primer durchgeführt:

100 ng	Plasmid-DNA
10 pmol	je Starter-Oligonukleotid (entweder 5` oder 3`)
200 µM	dNTPs (je 50 µM)
1 u	<i>PfuTurbo</i> [®] DNA Polymerase
2.5 µL	10x <i>Pfu</i> -Puffer
ad 25 µL	ddH ₂ O

In einem Thermozykler wurden zunächst zehn präPCR-Amplifikationszyklen durchgeführt, anschließend die entsprechenden Ansätze vereinigt und 0.5 u *Pfu*-Polymerase hinzupipettiert. Danach wurden 18 Amplifikationszyklen des gleichen Programms durchlaufen.

Vorgang	Temperatur	Dauer	Anzahl der Schritte
Prädenaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 s	10 Zyklen präPCR 18 Zyklen
Primer-Anlagerung	55-65°C	1 min	
Polymerase Reaktion	72°C	15 min	
abschl. Polymerase Reaktion	72°C	7 – 10 min	1
	4°C	∞	1

Die Hydrolyse durch die Restriktionsendonuklease *DpnI* erfolgte nach Abnahme eines Aliquots von 10 µL als Kontrolle für die analytische Agarosegelelektrophorese durch Zugabe von 10 U Enzym und anschließender einstündiger Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden 10 µL zur Transformation (Kapitel 2.2.1.8) eingesetzt.

2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer spezifischen Länge zur Analyse von DNA-Präparationen, Hydrolyse von DNA nach der Behandlung mit Restriktionsendonukleasen und PCR-Produkten sowie zur Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelkammern. Die Agarose wurde je nach erwarteter Fragmentlänge als 0.5-2%ige Lösung [w/v] in 1x TAE-Puffer (100 mM Tris/Acetat, 5 mM EDTA, Sambrook, J. *et al.*, 1989) oder in 1x TBE-Puffer (100 mM Tris-Base, 100 mM Borsäure, 5 mM EDTA; Sambrook, J. *et al.*, 1989) angesetzt und mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Als Laufpuffer

wurde 1x TAE bzw. 1x TBE verwendet. Die Gel-Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines 356 nm-UV-Leuchttisches und eines Videokameragesteuerten Druckers oder einer digitalen Geldokumentationsanlage (Biometra).

2.2.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Auftrennung der DNA in Agarosegelen (Kapitel 2.2.1.3) wurden die gewünschten cDNA-Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem QIAQUICK PURIFICATION SYSTEM (Qiagen) die DNA aus der Agarose entsprechend der Vorschrift des Herstellers isoliert. Die DNA wurde von den eingesetzten Säulen mit 30 µl ddH₂O eluiert. Nach der Aufreinigung wurde 1 µl des Eluates auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels eines DNA Längenstandards die Größe und Konzentration überprüft.

2.2.1.5 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA und PCR-Produkte wurden mit Restriktionsenzymen (Invitrogen Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche) nach Herstellerangaben behandelt. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer (30 % Glycerin, 40 % 1 M Tris pH 8.0, Bromphenolblau) gestoppt.

2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Um bei der Ligation (Kapitel 2.2.1.7) die Religation des linearisierten Vektors zu vermeiden, wurde die noch vorhandene 5'-Phosphatgruppe an beiden Seiten der Schnittstelle durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm abgespalten.

1-5 µg linearisierter Vektor wurden mit 7 µL ddH₂O und 1 µL CIP-Phosphatase versetzt. Nach Zugabe von 1 µL alkalischer Phosphatase (0.1 U/µL) wurde für eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde der Ansatz auf 56°C erhitzt und das Enzym somit inaktiviert. Nach anschließender Reinigung wurde der dephosphorylierte Vektor direkt zur Ligation eingesetzt.

2.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

10 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA wurden mit dem dreifachen Überschuss an isoliertem und gereinigtem Fragment versetzt. In den Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µL wurden 4 µL 5x Ligationspuffer (250 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 10 mM ATP) und 1U T4 DNA-Ligase gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2-4 Stunden bei RT oder ü.N. bei 16°C wurden 10 µL zur Transformation von kompetenten Bakterien (Kapitel 2.2.1.8) eingesetzt.

2.2.1.8 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*

Medien

- LB-Medium: 10 g/L Bacto-Pepton, 7.5 g/L Natriumchlorid, 5 g/L Hefe-Extrakt, Einstellung des pH-Wertes auf 7.4, autoklavieren; Antibiotika-Zusätze: 100 µg/L Ampicillin oder 25 µg/L Kanamycin
- LB-Platten: 10 g/L Bacto-Pepton, 7.5 g/L Natriumchlorid, 5 g/L Hefe-Extrakt, 15 g/L Bacto-Agar, Einstellung des pH-Wertes auf 7.4, autoklavieren; Antibiotika-Zusätze: 100 µg/L Ampicillin oder 25 µg/L Kanamycin

2 mL LB-Medium wurde für die Herstellung kompetenter *E. coli* TOP10F' mit einer Kolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C inkubiert. Die gesamte 2 mL Kultur wurde in 200 mL LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3-0.6 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Die Bakterienzellen wurden 10 Min auf Eis abgekühlt, anschließend wurden die Zellen 15 Min bei 4°C und 3000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20 mL eiskaltem TSP-Puffer (1 x LB-Medium, 10 % [w/v] PEG, 5 % [v/v] DMSO, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂) aufgenommen und 10 Min bei 4°C inkubiert. Die Bakterien wurden in 500 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Zur Transformation wurden 100 µL auf Eis aufgetaute kompetente *E. coli* verwendet. Zur Retransformation von DNA wurde 1 µL DNA und zur Transformation eines Ligationsansatzes (Kapitel 2.2.1.7) bzw. eines Ansatzes aus der QuikChange Mutagenese (Kapitel 2.2.1.2) wurden 10 µL eingesetzt. Die DNA

wurde mit 20 µL 5x KCM (0.5 M KCl, 0.15 M CaCl₂, 0.25 M MgCl₂) in einem 100 µL Ansatz kurz auf Eis inkubiert, bevor dieser mit 100 µL kompetenten *E. coli* vermischt wurde. Nach der Inkubation für 30 Min auf Eis wurde der gesamte Ansatz mit 1000 µL LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Ausplattieren des Ansatzes auf LB-Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotika-Selektion mit Hilfe eines Drigalski-Spatels zeigten sich nach Inkubation ü.N. bei 37°C Kolonien.

2.2.1.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für Minipräparationen wurden 5 ml mit entsprechendem Antibiotikum versetztem LB-Medium mit einer Bakterienkolonie inokuliert und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Das Pellet von 3 ml der Bakteriensuspension wurde zur Isolierung der Plasmid-DNA eingesetzt. Die Isolierung erfolgte mit Hilfe des NUCLEO SPIN PLASMID (Macherey & Nagel) gemäß den Herstellerangaben. Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 100 mL entsprechend hergestellten Bakteriensuspensionen wurde mit dem NUCLEOBOND AX 100 KIT (Macherey & Nagel) durchgeführt.

2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Die automatische Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte nach der Didesoxy-Methode von Sanger, F. *et al.* (1977), dies erfolgte im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie bzw. Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) mit einem 377 ABI PRISM™ Sequenzierungsautomat (Applied Biosystems). Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des *ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* (Applied Biosystems) durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden jeweils 200-300 ng DNA und 10 pmol eines Oligonukleotids in einem Volumen von 11 µL verwendet.

2.2.2 RNA: Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RT-PCR

Die reverse Transkription von 1 µg Gesamt-RNA aus Rattengeweben einschließlich der isolierten und präparierten Geschmacksgewebe wurde mit

Hilfe der reversen Transkriptase *Superscript II* (Invitrogen Life Technologies) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die anschließende PCR erfolgte in einem Ansatz von 25 µl mit dem Master Mix (Qiagen) je nach Bedarf mit verschiedenen Oligonukleotiden (siehe Kapitel 2.1.1), wobei je 5 µl der 1:10 verdünnten cDNA eingesetzt wurden.

2.2.3 Proteine: Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*)

Je nach Proteingröße wurden 8-15%ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook, J. *et al.*, 1989) zur Auftrennung von Proteinen eingesetzt. Pro Gelspur wurden 20-30 µl Proteinextrakt, der mit 5x Probenpuffer (50 % [v/v] Glycerin, 0.5 M DTT, 10 % [w/v] SDS, 0.4 M Tris-HCl, pH 6.8, Bromphenolblau; Laemmli, U.K. *et al.*, 1970) versetzt und zur Denaturierung und Spaltung von Disulfidbrücken für 15 Min. auf 55°C erhitzt wurde, aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-Base, 19.2 mM Glycin, 0.1 % [w/v] SDS) für ein bis zwei Stunden bei 180 V in einer Gel-Apparatur. Ein vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsstandard (FULL RANGE RAINBOW Marker, Amersham Pharmacia) wurde zur Bestimmung der Proteingrößen verwendet.

2.2.3.2 Transfer und immunologische Detektion von Proteinen auf Nitro-zellulosemembranen (*Western Blot*)

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurden diese nach der Auftrennung in SDS-Gelen (Kapitel 2.2.3.1) elektrophoretisch auf eine Nitro-zellulosemembran (PROTAN, Schleicher & Schuell) übertragen. Der Transfer erfolgte nach Angaben der Hersteller von Membran und Blot-Apparatur in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20 % [v/v] Methanol) für etwa ein bis zwei Stunden bei max. 20 V und 150 mA. Nach der Übertragung wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit Blockierlösung (5 % [w/v] Magermilchpulver in TBS-T [150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1 % [v/v] Tween-20]) inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T gewaschen. Die Reaktion mit dem primären Antikörper (Tabelle 2-1), der entsprechend in Blockierlösung (2 % BSA in TBS-T) verdünnt wurde, erfolgte für ein bis zwei Stunden bei RT

oder ü.N. bei 4°C. Nach drei fünfminütigen Waschschrinen mit TBS-T folgte die Inkubation mit dem entsprechenden HRP (*horseradish peroxidase*) gekoppelten sekundären Antikörper (Tabelle 2-1) für eine Stunde bei RT. Im Anschluss an drei weitere Waschschrine erfolgte die Detektion der mit dem Antikörper markierten Proteine mit dem ECL-Reagenz (*Enhanced Chemiluminescence*; LUMI-LIGHT WESTERN BLOTTING SUBSTRATE, Roche Diagnostics) bzw. Super Signal West Femto (Pierce, Bonn) nach Vorschrift des Herstellers auf Röntgenfilmen (CRONEX MEDICAL X-RAY Film, Sterling Biodiagnostic Imaging, Kodak Biomax MR, Kodak).

2.2.3.3 Koimmunpräzipitation aus transient transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden 30-48 Stunden nach der Transfektion (Kapitel 2.2.4.2) zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Lyse der Zellen mit 500 µl CoIP-Puffer (120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.5 % [v/v] Igepal, 3.4 µg/mL Aprotinin, 0.01 mM Leupeptin, 0.01 mM Pepstatin A, 0.4 mM PMSF) pro Kulturschale versetzt und 30 Min bei 4°C inkubiert. Die DNA und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (13200 rpm, 15 Min, 4°C) entfernt. Von dem Überstand wurden jeweils 50 µL abgenommen und nach Zugabe von 1/5 Laemmli-Puffer auf 55°C erhitzt. Der verbleibende Überstand wurde mit 2-5 µg Antikörper für zwei Stunden bei 4°C auf einem Rotator inkubiert und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß mit 20 µl Protein G-Agarose überführt. Die Agarose wurde vor der Zugabe des Lysats einmal mit CoIP-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit Agarose erfolgte für 4-6 h oder ü.N. bei 4°C auf einem Rotator. Danach wurde die Agarose fünfmal mit CoIP-Puffer gewaschen und anschließend in 40 µl 2x Laemmli resuspendiert. Im Falle einer Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG Antikörper wurden EZVIEW RED ANTI-FLAG M2-AGAROSE BEADS (Sigma-Aldrich) nach Angaben des Herstellers verwendet. Ausgangsmaterial und Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.3.1) und Western Blot (Kapitel 2.2.3.2) analysiert.

2.2.3.4 Behandlung von Proteinextrakten mit Endoglykosidasen

HEK293-Zellen wurden 30-48 Stunden nach der Transfektion (Kapitel 2.2.4.2) zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zur Lyse der Zellen mit 200 µl CoIP-Puffer pro Kulturschale versetzt und 30 Min bei 4°C inkubiert. Die DNA und andere unlösliche Bestandteile werden durch Zentrifugation (13200 rpm, 15 Min, 4°C) entfernt.

Für die Endoglykosidasen-Behandlung wurden 60 µL des Zell-Lysates mit 1/10 Denaturierungspuffer (0.5 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol) versetzt und für 15 Min auf 55°C erhitzt. Dieser Ansatz wurde in drei Aliquots aufgeteilt und mit den Puffern G5 (50 mM Na-Zitrat) für die Behandlung mit Endo H bzw. G7 (50 mM Na-Phosphat, 1% Nonidet P-40) mit PNGase F nach Angaben des Herstellers versetzt. Nach Zugabe von 0.1 u Enzym wurden die Ansätze ü.N. bei 37°C inkubiert, nach Zugabe von 1/5 Laemmli-Puffer auf 55°C erhitzt und mittels SDS-PAGE (Kapitel 2.2.3.1) und Western Blot (Kapitel 2.2.3.2) analysiert.

2.2.4 Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Medien

- HEK293-Zellen: DMEM 4500 mg/mL Glukose, 10 % [v/v] FCS (inaktiviert; 30 Min., 56°C), 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin
- Transfektionsmedium HEK293-Zellen: DMEM 4500 mg/mL Glukose, 10 % [v/v] FCS (inaktiviert; 30 Min, 56°C)
- Z41 (rTas1r2/rTas1r3): DMEM 1000 mg/mL Glukose, 10 % [v/v] FCS (inaktiviert; 30 Min, 56°C), 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 200 µg/mL G 418, 100 µg/mL Hygromycin
- Transfektionsmedium für Z41: DMEM 1000 mg/mL Glukose, 10 % [v/v] FCS (inaktiviert; 30 Min, 56°C), 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin

Die Zellen der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 wurden in DULBECCO`S MODIFIED EAGLE MEDIUM mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum, 100 u/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin in Zellkultur-

schalen (\varnothing 10 cm) bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 0.25 % Trypsin in Versene-Puffer (137 mM NaCl, 8.8 mM Na₂HPO₄, pH 7.4, 2.7 mM KCl, 0.7 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA) inkubiert, bis sich die Zellen von den Schalen ablösen. Die Zellsuspension wurde mit dem achtfachen Volumen an DMEM verdünnt und auf neue Kulturschalen überführt. Diese Prozedur wurde etwa alle drei Tage wiederholt.

2.2.4.2 Transfektion von HEK293-Zellen mit FuGENE 6

24 Stunden vor der Transfektion mit FuGENE 6 wurden die Zellen auf 6 cm Platten, 6-Loch-Platten oder 12-Loch-Platten in DULBECCO`S MODIFIED EAGLE MEDIUM mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalen Kälberserum ohne Antibiotika-Zusätze ausplattiert. Für die Transfektion in 6 cm Platten wurden 200 µL Opti-MEM (Invitrogen) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt und nach der Zugabe von 6 µL FuGENE 6 für eine Einfach-Transfektion bzw. 12 µL FuGENE 6 für eine Ko-Transfektion der Ansatz für 5 Min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde für eine Einfach-Transfektion 2 µg Plasmid-DNA und für eine Ko-Transfektion von jedem Plasmid 2 µg DNA eingesetzt und für 25 Min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Medium der Zellen gewechselt. Nach der Zugabe des Transfektionsansatzes wurden die Zellen für 30-48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Für andere Plattentypen wurde der Transfektionsansatz nach Tabelle 2-3 angepasst.

Tabelle 2-3: Pipettierschema für die Transfektion mit FuGENE6 in verschiedenen Plattentypen.

Plattentyp	Menge an Opti-MEM	Menge an FuGENE6	Menge an Plasmid-DNA
6 cm	200 µL	6.0 µL (12 µL)	2.0 µg
6-Loch	100 µL	3.0 µL (6 µL)	1.0 µg
12-Loch	50 µL	1.5 µL (3 µL)	0.5 µg

2.2.4.3 Immunzytochemie und Mikroskopie

Transient transfizierte HEK293-Zellen wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete (0.1 mg/ml, Sigma) Deckgläser in 12-Loch-Platten ausgesät, transfiziert und für

zwei Tage kultiviert. Zur Fixierung der Zellen wurde ein Volumen 4%iges Paraformaldehyd in PBS (137 mM NaCl, 8.8 mM Na₂HPO₄, 2.7 mM KCl, 0.7 mM KH₂PO₄) in das Kulturmedium gegeben. Nach zehnminütiger Einwirkung bei RT wurde diese Lösung durch 4%iges Paraformaldehyd in PBS ersetzt. Nach weiteren 10 Min wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 5 Min in PGS (0.5 g Glycin, 0.05 g Saponin in 100 mL PBS) permeabilisiert. Die unspezifischen Bindungsstellen auf den Zellen wurden für eine Stunde bei RT mit 2 % BSA in PGS blockiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper (verdünnt in 2 % BSA in PGS) erfolgte für eine Stunde bei 37°C oder ü.N. bei 4°C. Die Deckgläser wurden dann zweimal mit PBS und zweimal in PGS gewaschen und mit entsprechenden fluoreszierenden Sekundärantikörpern (verdünnt in 2 % BSA in PGS) bei RT für eine Stunde inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen dreimal mit PBS sowie einmal mit H₂O gewaschen und auf Objektträger in PERMAFLUOR MOUNTING MEDIUM (Beckman Coulter) eingebettet. Die Verdünnungen der verwendeten Antikörper sind Tabelle 2-1 zu entnehmen.

2.2.4.4 Kultivierung und Transfektion von HEK293 für Calcium-Imaging

Zur Transfektion von Zellen in einer 96-Loch-Platte wurden pro Loch 0.15 µg Plasmid-DNA in 12.5 µl serumfreiem DMEM gelöst. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 0.3 µl Lipofektamin 2000 (Invitrogen) in 12.5 µl serumfreiem DMEM genau 5 Min bei RT inkubiert. Danach wurden beide Komponenten vereinigt, durch Pipettieren gemischt und dann für 20-30 Min bei RT inkubiert. In dieser Zeit bildet sich der DNA-Lipofektamin-Komplex. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium der Zellen entfernt und durch serumfreies DMEM (75 µl/Loch) ersetzt. Nach 20 Min wurde in jedes Loch der Platte 50 µl des DNA-Lipofektamin-Komplex pipettiert und dann im Brutschrank inkubiert, nach 3-4 Stunden das Medium abgesaugt und durch serumhaltiges Kulturmedium ersetzt.

2.2.4.5 Calcium-Imaging im heterologen Expressionssystem

24-33 Stunden nach der Transfektion wurde das Kulturmedium entfernt und gegen 50 µl der Lösung C2 (10 mL serumfreies Zellkulturmedium; 10 µL Fluo-4-AM; 100 µL Probenicid) ausgetauscht. In dieser Lösung wurden die Zellen dann 45 Min im Inkubator mit dem Farbstoff beladen, danach die Farbstofflösung durch Waschen (1 mL C1-Lösung/Loch) mit dem Cellwasher (Denley) entfernt. Der Waschvorgang war so eingestellt, dass 100 µL C1 (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose; pH 7.4; 2 mM CaCl₂) in jedem Loch der Messplatte verblieben. Der Waschvorgang wurde noch zweimal im Abstand von je 30 Min wiederholt, um von den Zellen ausgeschiedene Farbstoffreste zu entfernen. Direkt nach dem letzten Waschen wurden die Zellen im FLIPR (Fluorescence Imaging Plate Reader, Molecular Devices) vermessen. Die Liganden wurden zweifach konzentriert in C1-Lösung hergestellt, um den Verdünnungseffekt von 50 µL Ligandenkonzentrat auf 100 µL C1-Lösung zu berücksichtigen. Direkt nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen im FLIPR nach folgendem Programm vermessen, wobei die Blendenöffnungszeit 0,4 Sekunden betrug und der Laser 0,35 Watt im „Constant Light“ Modus eingestellt war:

1. Aufzeichnen der Basislinie: 10 Bilder im Abstand von 6 Sekunden.
2. Applikation erster Ligand: Volumen 50 µl, Pipettiergeschwindigkeit 25 µl/s, 120 Bilder im Abstand von 1 Sekunde.
3. Aufzeichnung der Basislinie: 100 Bilder im Abstand von 6 Sekunden.
4. Applikation zweiter Ligand: Volumen 50 µl, Pipettiergeschwindigkeit 25 µl/s, 120 Bilder im Abstand von 1 Sekunde.
5. Aufzeichnung der Basislinie: 20 Bilder im Abstand von 6 Sekunden.

Den Zellen wurde die Testsubstanz (Ligand 1) und als Kontrolle der intrazellulären Signalkaskade und zum Ausschließen methodischer Fehlerquellen SST-14 (Sigma-Aldrich, Ligand 2) in einer Endkonzentration von 1:10000 appliziert. Die Veränderung des intrazellulären Ca²⁺-Spiegels wurde mit Hilfe des FLIPR verfolgt und anschließend über das Software Programm *FLIPR Control* (Molecular Devices) und *Prism* ausgewertet.

2.2.5 Arbeiten mit Hefe

Das Hefe Zwei-Hybrid-System beruht auf der Aufspaltung eines transkriptionellen Aktivatorproteins in einen Teil, der die Bindung an spezifische DNA-Motive (*cis*-regulatorische Elemente) erlaubt, und in einen Teil, der die transkriptionelle Aktivierung vermittelt. Die im Hefe Zwei-Hybrid-System eingesetzten Hefestämme sind defizient für das entsprechende Aktivatorprotein. In dieser Arbeit wurde das GAL4-Hefe Zwei-Hybrid-System der Firma BD Clontech eingesetzt, bei dem das Aktivatorprotein GAL4 für die transkriptionelle Regulation der eingesetzten Reportergene verantwortlich ist (Fields und Song, 1989, Chien et. al., 1991). Sowohl die GAL4-DNA-Bindungsdomäne (GAL4-BD) als auch die GAL4-Aktivator-domäne (GAL4-AD) wurden durch verschiedene Vektoren kodiert.

Nach Ko-Transfektion in Hefen wurden die Proteine exprimiert. Kam es zu einer Interaktion eines Proteins der cDNA-Bibliothek mit dem Köderprotein, wurde das GAL4-Protein rekonstituiert und konnte die Transkription verschiedener Reportergene aktivieren.

2.2.5.1 Eingesetzte Selektionsmarker

Die Selektion wurde durch das Weglassen von bestimmten Aminosäuren im Medium oder in den SD-Platten erreicht, für die in dem verwendeten Hefestamm keine Synthesemöglichkeit bestand. Bei den Selektionsmarkern wurde zwischen Transformationsmarkern (Anwesenheit des Plasmids in der Hefezelle) und den Interaktionsmarkern (durch Interaktion aktivierte Reportergene) unterschieden.

Sowohl das Plasmid, das für das Köderprotein kodiert (Köderplasmid), als auch das Plasmid, das die cDNA-Klone enthält, sind mit verschiedenen Transformationsmarkern ausgestattet. Für die Köder bzw. die cDNA-Klone wurden die beiden Vektoren pGADT7 (enthält die cDNA-Klone) und pGBKT7 (enthält die Köder) eingesetzt. Da aus dem gemeinsamen Vorhandensein des Köderplasmids und eines cDNA-Klons in einer Hefezelle noch nicht auf eine Interaktion geschlossen werden kann, gibt es zusätzliche Interaktionsmarker als Reportergene (ADE2, HIS3, LacZ und MEL1). Die verwendeten Hefestämme

(siehe auch Kapitel 2.1.9) ermöglichen den Einsatz verschiedener Selektionsmarker.

2.2.5.2 Transformation von Hefezellen

Medien

- Kulturmedium YPDA: 50 g/L YPD, 0.0003 % Adenin-Hemisulfat, autoklavieren
- YPDA-Platten: 50 g/L YPD, 0.0003 % Adenin-Hemisulfat, 20 g/L Agar autoklavieren
- Selektionsmedien DOB mit verschiedenen Zusätzen:
DOB -L: 27 g/L DOB, 0.69 g/L -L; DOB -T: 27 g/L DOB, 0.74 g/L -T;
DOB -L/T : 27 g/L DOB, 0.64 g/L -L/T; DOB -A/H/L/T : 27 g/L DOB, 0.61 g/L -A/H/L/T; autoklavieren
- Selektionsplatten DOB mit verschiedenen Zusätzen:
DOB -L: 27 g/L DOB, 0.69 g/L -L, 20 g/L Agar; DOB -T: 27 g/L DOB, 0.74 g/L -T, 20 g/L Agar; DOB -L/T : 27 g/L DOB, 0.64 g/L -L/T, 20 g/L Agar; DOB -A/H/L/T : 27 g/L DOB, 0.61 g/L -A/H/L/T, 20 g/L Agar; autoklavieren

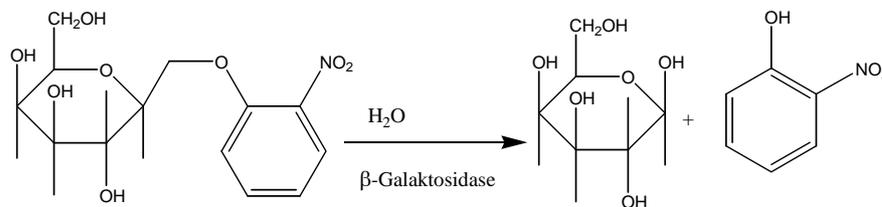
Für die Transformation nach Gietz und Wood (1994) wurden 50 mL YPDA mit 5 mL einer ü.N.-Kultur von AH109 bzw. Y187-Hefezellen angeimpft und bei 30°C geschüttelt bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0.4-0.6 erreicht hatte. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 Min, 3000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde abgegossen, die Zellen in 50 mL H₂O resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet mit den Hefezellen wurde in 3 mL TE-LiOAc-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) resuspendiert, kurz zentrifugiert und nochmals in 1.5 mL TE-LiOAc-Lösung aufgenommen. Für die Transformation wurden der nachfolgenden Ansatz in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert:

240 μL	50%iges [w/v] PEG 3350
36 μL	1 M LiOAc
25 μL	Heringsspermien-DNA (2 mg/mL)
50 μL	ddH ₂ O
Plasmid-DNA (bis zu 10 μg)	

Anschließend wurde die Mischung zu 100 μL kompetenten Hefezellen gegeben, gut gemischt und 30 Min bei 30°C im Inkubator geschüttelt. Nach Zugabe von 70 μL DMSO erfolgte für 15 Min ein Hitzeschock bei 42°C. Die Hefezellen wurden kurz pelletiert, der Überstand abgenommen, in 1000 μL YPDA resuspendiert und für 60 Min bei 30°C geschüttelt. Die Kultur wurde abzentrifugiert, in 250 μL Wasser aufgenommen und je 100 μL auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und für mehrere Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

2.2.5.3 β -Galaktosidase-Test

Die photometrische Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität beruht auf der Umsetzung des farblosen Enzymsubstrates o-Nitrophenylgalaktosid (ONPG) zu dem gelb löslichen Produkt o-Nitrophenol.



Zur Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität wurden 10 mL Selektionsmedium mit 2-3 Hefekolonien angeimpft und bis zu einer $\text{OD}_{600} \geq 1$ bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Für je eine Doppelbestimmung wurden 1.5 mL der Kultur abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet mit 1000 μL Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0) gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200 μL Z-Puffer resuspendiert. 100 μL wurden zur Bestimmung der OD_{600} mit 1000 μL Wasser verdünnt. Aus den restlichen 100 μL wurde durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigen Stickstoff ein Extrakt hergestellt. Durch Zugabe von 860 μL frisch

angesetzter ONPG-Substratlösung (27 %_{v/v} β-Mercaptoethanol, 3 mM ONPG in Z-Puffer) wurde die Enzymreaktion gestartet, nach 1 - 2 Stunden Inkubationszeit (je nach Farbentwicklung) die Reaktion durch Zugabe von 400 µL 1 M Na₂CO₃-Lösung gestoppt. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm wurde die Extinktion des Überstandes bei 420 nm photometrisch bestimmt. Als Nullkontrolle diente Z-Puffer. Die Enzymaktivität in β-Galaktosidaseeinheiten wurde mit der nachfolgenden Formel berechnet:

$$1000 \times OD_{420} / (t \times V \times OD_{600});$$

t= Reaktionszeit [min], V= Kulturvolumen [ml]

3 Ergebnisse

Der nachfolgende Ergebnisteil dieser Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte. Unter Kapitel 3.1 ist der Einfluss der N-Glykosylierung und des C-Terminus auf die Dimerisierung, Lokalisierung und Funktionalität des Süßgeschmacksrezeptors - rTas1r2 und rTas1r3 - dargestellt. Im zweiten Teil (Kapitel 3.2) wird ein neuer möglicher Interaktionspartner - Fhl-2 - der C-Termini des rTas1r1 und rTas1r2 beschrieben.

3.1 Untersuchungen der N-Glykosylierungsstellen am N-Terminus des rTas1r2 und rTas1r3

3.1.1 Herstellung der Rezeptormutanten

Für andere Mitglieder der Subfamilie C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), z.B. den metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) und dem humanen Calcium *sensing*-Rezeptor (hCaSR), ist bekannt, dass N-terminale Modifikationen wie z.B. N-Glykosylierung wichtig sind für die korrekte Proteinfaltung, den Schutz vor Proteolyse, den intrazellulären Transport und die Oberflächenexpression. Die meisten sekretorischen und Plasmamembranproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Komplex glykosyliert. Es werden N-glykosidisch (an Asparaginreste) oder O-glykosidisch (an Serin- und Threoninreste) angefügte Zuckerketten unterschieden.

Die Vorhersage der potentiellen N-Glykosylierungspositionen wurde mit Hilfe des Computerprogramms NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) durchgeführt (Auswertung des Computerprogramms siehe Anhang Kapitel 7). Um zu untersuchen, in wieweit die potentiellen N-Glykosylierungsstellen der Rezeptoren der rTas1r-Familie, die den Süßgeschmacksrezeptor bilden, benutzt werden und welchen Einfluss sie auf die Ligandenbindung, die Dimerisierung und den Transport zur Plasmamembran haben, wurde durch gerichtete Mutagenese das Asparagin der Konsensus-Sequenz Asn-Xaa-Ser/Thr in ein Glutamin mutiert. In Tabelle 3-1 sind diese potentiellen N-Glykosylierungsstellen zusammengefasst. In der linken Spalte sind die Asparagine der potentiellen N-Glykosylierungspositionen aufgeführt. In der jeweils rechten

Spalte der Tabelle sind die Rezeptormutanten zusammengestellt, die in dieser Arbeit verwendet worden sind.

Tabelle 3-1: Zusammenstellung der potentiellen N-Glykosylierungspositionen des rTas1r2 und rTas1r3 in seinen extrazellulären Domänen

Aufgeführt sind die Positionen der Asparagine der Rezeptoren rTas1r2 und rTas1r3, die nach dem Programm NetNGlyc 1.0 potentiell glykosyliert werden können, und die Bezeichnung der Rezeptormutanten, die durch gerichtete Mutagenese des Asparagins der Konsensus-Sequenz Asn-Xaa-Ser/Thr in ein Glutamin hergestellt worden sind.

rTas1r2		rTas1r3	
Position der Konsensus-Sequenz	Rezeptor mutanten	Position der Konsensus-Sequenz	Rezeptor mutanten
N 87	rTas1r2 _{N87Q}	N 85	rTas1r3 _{N85Q}
N 296	rTas1r2 _{N296Q}	N 130	rTas1r3 _{N130Q}
N 316	rTas1r2 _{N316Q}	N 203	rTas1r3 _{N203Q}
N 355	rTas1r2 _{N355Q}	N 264	rTas1r3 _{N264Q}
N 372	rTas1r2 _{N372Q}	N 379	rTas1r3 _{N379Q}
N 432	rTas1r2 _{N432Q}	N 387	rTas1r3 _{N387Q}
N 484	rTas1r2 _{N484Q}	N 418	rTas1r3 _{N418Q}
N 491	rTas1r2 _{N491Q}	N 439	rTas1r3 _{N439Q}
N 531	rTas1r2 _{N531Q}	N 482	rTas1r3 _{N482Q}

Als Ausgangsplasmide für die gerichtete Mutagenese (2.2.1.2) dienten die beiden Wildtyp-Rezeptoren in pcDNA3-rTas1r2_{WT}-HSV und pcDNA3-rTas1r3_{WT}-3xFLAG, die die beiden cDNA-Sequenzen der Rezeptoren, und gleichzeitig jeweils ein C-terminales Epitop zum Nachweis mit spezifischen Antikörpern enthalten. Die Überprüfung der Mutation erfolgte jeweils durch Sequenzierung. Bei der Herstellung der Oligonukleotide wurde darauf geachtet, dass sich die zu mutierende Sequenz im Zentrum des Oligonukleotids befindet.

Nach der Herstellung der verschiedenen Rezeptor-Mutanten wurden HEK293-Zellen mit diesen Plasmiden transient transfiziert und die Zell-Lysate mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. In einem weiteren Schritt wurden die Fusionsproteine immunologisch nachgewiesen.

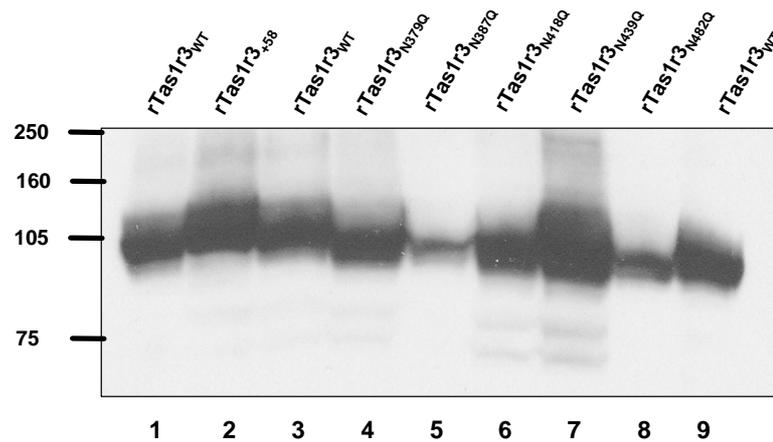


Abbildung 7: Größenvergleich des rTas1r3 Wildtyps und ausgewählter rTas1r3-Mutanten.

Hierfür wurden HEK293-Zellen mit dem Wildtyp-Rezeptor rTas1r3 (rTas1r3_{WT}) und ausgewählten Mutanten (rTas1r3₊₅₈, rTas1r3_{N379Q}, rTas1r3_{N387Q}, rTas1r3_{N418Q}, rTas1r3_{N439Q} und rTas1r3_{N482Q}) transfiziert, das Zell-Lysat elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte über die C-terminalen FLAG-Epitope mit einem Anti-FLAG-Antikörper (Anti-FLAG). Aufgetragen wurde in Spur 1,3 und 9: rTas1r3_{WT}, in Spur 2: rTas1r3₊₅₈, Spur 4: rTas1r3_{N379Q}, Spur 5: rTas1r3_{N387Q}, Spur 6: rTas1r3_{N418Q}, Spur 7: rTas1r3_{N439Q} und in Spur 8: rTas1r3_{N482Q}.

In Abbildung 7 ist ein Größenvergleich des rTas1r3_{WT} und verschiedener rTas1r3-Mutanten dargestellt. Links außen wurde ein Proteinmarker aufgetragen, der in dieser Abbildung durch Linien mit den dazugehörigen Proteingrößen dargestellt ist. In den Spuren 1, 3 und 9 wurde rTas1r3_{WT} aufgetragen, der mit einem Molekulargewicht von 105 kDa detektiert wird. In der Spur 2 ist rTas1r3₊₅₈, eine Rezeptormutante, die eine zusätzliche N-Glykosylierungsstelle an der Position N 58 trägt (siehe Kapitel 3.1.4), aufgetragen. Im Vergleich der Spuren 1 und 2 ist ein leicht vergrößertes Molekulargewicht in der Spur 2 erkennbar. Dies spricht dafür, dass die zusätzlich eingeführte N-Glykosylierungsposition N 58 benutzt wird. In den Spuren 4-8 sind verschiedene rTas1r3 Mutanten (rTas1r3_{N379Q}, rTas1r3_{N387Q}, rTas1r3_{N418Q}, rTas1r3_{N439Q} und rTas1r3_{N482Q}) aufgetragen. Sie zeigen ein leicht verringertes Molekulargewicht im Vergleich zum Wildtyprezeptor. Die veränderten Molekulargewichte entsprechen in etwa der erwarteten Größenordnung, wenn man pro N-Glykosylierung etwa 3 kDa an Molekulargewicht annimmt.

Aus diesen Expressionsexperimenten des rTas1r3 zeigt sich, dass verschiedene N-Glykosylierungsmutanten in HEK293-Zellen exprimiert werden können. Außerdem konnte für die Mutante N 58, mit einer zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle, gezeigt werden, dass sie ein leicht erhöhtes Molekulargewicht im Vergleich zum Wildtyp aufweist, während die N->Q-Glykosylierungsmutanten ein leicht reduziertes Molekulargewicht besitzen.

Ein ähnlicher Western Blot kann für den rTas1r2_{WT} und seine Mutanten aufgrund des schlechten Laufverhaltens des rTas1r2 im Western Blot und der daraus resultierenden schwierigen Charakterisierung der Proteinbanden nicht gezeigt werden (siehe Kapitel 3.1.2 Abbildung 9). Auch durch Veränderungen am Proteingel (Zusatz von 8 M Harnstoff), Veränderungen der Temperatur zur Denaturierung der Proben oder durch unterschiedliche Probenpuffer (verschiedene Zusätze an SDS, DTT oder β -Mercaptoethanol) konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Deglykosylierung des rTas1r2 und rTas1r3 mit Endoglykosidasen

Sekretorische und Plasmamembranproteine werden im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und im Golgi-Komplex modifiziert. Eine erfolgreiche N-Glykosylierung mit mannosereichen Zuckerketten spricht für einen Transport des Proteins in das ER, die Modifikation zu einem komplexen Zucker für den Weitertransport in den Golgi-Komplex. Durch eine Behandlung der Proteine mit den Endoglykosidasen Endo H und PNGase F kann unterschieden werden, ob es sich bei den N-glykosidisch gekoppelten Oligosacchariden um mannosereiche oder komplexe Zuckerketten handelt.

Die in Tabelle 3-1 aufgeführten Rezeptor-Konstrukte wurden transient in HEK293-Zellen transfiziert und die Zell-Lysate mit den Endoglykosidasen Endo H und PNGase F behandelt (Kapitel 2.2.3.4). Nach der Endoglykosidasen-Behandlung wurden die Proteine mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend immunologisch mit einem Anti-FLAG-Antikörper detektiert.

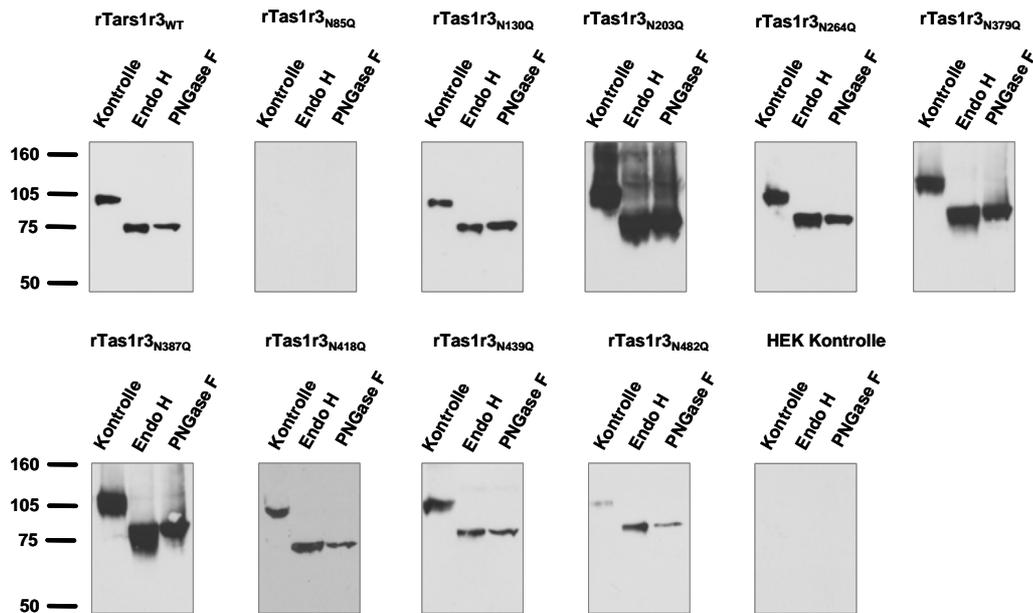


Abbildung 8: Behandlung von rekombinant überexprimiertem rTas1r3-3xFLAG Wildtyp und seinen Mutanten mit den beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F.

Hierfür wurden HEK293 Zellen mit den verschiedenen rTas1r3 Mutanten transfiziert und das Zell-Lysat anschließend mit der Endoglykosidase Endo H oder PNGase F behandelt. Der Nachweis der Rezeptormutanten erfolgte über ihre Epitop-Markierung mit einem Anti-FLAG-Antikörper. Alle rekombinant überexprimierten rTas1r3 Mutanten und rTas1r3_{WT} weisen eine Endo H Sensitivität auf.

In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der Endoglykosidasen-Behandlung des rTas1r3_{WT} und seiner verschiedenen Rezeptormutanten zusammengestellt. Dabei zeigt sich, dass es sich um mannosereiche Zuckerketten handelt, mit denen der rTas1r3 modifiziert wurde. Dies ist an der Sensitivität der angehängten Zuckerketten gegenüber der Endoglykosidase Endo H erkennbar, die Zuckerketten nur schneidet, wenn sich noch Mannosereste in der Kette befinden. Aufgrund des ca. 30 kDa Unterschiedes in der Proteingröße zwischen Kontrolle und Endoglykosidasen-Behandlung lässt diese Analyse den Schluss zu, dass alle neun potentiellen N-Glykosylierungsstellen benutzt werden. Dabei wird ein Molekulargewicht von ca. 3 kDa pro Oligosaccharidkette angenommen. Ebenso wird deutlich, dass die rTas1r3_{N85Q}-Mutante sich nicht im Lysat nachweisen lässt. Als Grund für die schlechte Detektion im Western Blot kann vermutet werden, dass die N-Glykosylierungsstelle N 85 Einfluss auf die Stabilität des Rezeptors nimmt. In weiteren Experimenten konnte grundsätzlich eine Ex-

pression dieser Rezeptormutante mit Hilfe einer Ko-Immünpräzipitation mit rTas1r2_{WT} nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1.3 in Abbildung 12).

Die Mutante rTas1r3_{N203Q} zeigt mehrere Banden mit einem höheren Molekulargewicht. Ein Fehlen der N-Glykosylierungsstelle N 203 des rTas1r3 scheint dazu zu führen, dass es zur Bildung von Dimeren und Oligomeren kommt, die durch das DTT im Probenpuffer nicht zerstört werden. Dieses Verhalten entspricht dem, dass auch für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben wurde (Bouvier, 2001; Hurlley & Helenius, 1989).

Die untransfizierten HEK293-Zellen (Kontrolle) zeigen keine unspezifischen Banden im Western Blot vor oder nach der Endoglykosidasen-Behandlung mit dem anti-FLAG-Antikörper.

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass offenbar weder der Wildtyprezeptor noch eine der Glykosylierungsmutanten des rTas1r3 den Golgi-Apparat erreicht, was eine Voraussetzung für einen erfolgreichen Transport zur Membran ist.

In Abbildung 9 sind ähnliche Experimente für den rTas1r2_{WT} und eine Auswahl seiner Mutanten gezeigt. Experimentell wurde wie zuvor beschrieben vorgegangen und der rTas1r2_{WT} und seine Mutanten immunologisch mit einem Anti-HSV-Antikörper detektiert.

Bei den hier dargestellten Ergebnissen für den rTas1r2 sind sehr viele Banden im Western Blot zu erkennen, die nicht genau zugeordnet werden können. Daraus folgt, dass kein Unterschied zwischen den beiden eingesetzten Endoglykosidasen und somit keine Unterscheidung zwischen mannosereichen und komplexen Zuckerketten gemacht werden kann. In vielen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass der rTas1r2 ein anderes Laufverhalten in der SDS-PAGE zeigt als der rTas1r3. Bei alleiniger Transfektion läuft rTas1r2 (Wildtyp bzw. auch in dieser Arbeit hergestellte N-Glykosylierungsmutanten) oft in vielen einzelnen Banden. Oft zeigt sich zusätzlich auch ein starke Bande bei ca. 300 kDa. Diese Bande spricht für eine Oligomerisierung des Rezeptors (Bouvier, 2001). Wie schon in Kapitel 3.1.1 erwähnt, lässt sich das Verhalten des Rezeptors und seiner N-Glykosylierungsmutanten nicht durch Veränderung in der experimentellen Durchführung beeinflussen. Durch Ko-Im-

munpräzipitationsexperimente (Ko-IP) konnte jedoch gezeigt werden, dass rTas1r2 mit einer Bande bei 105 kDa detektiert werden kann (weiterführende Erklärungen siehe Kapitel 3.1.3).

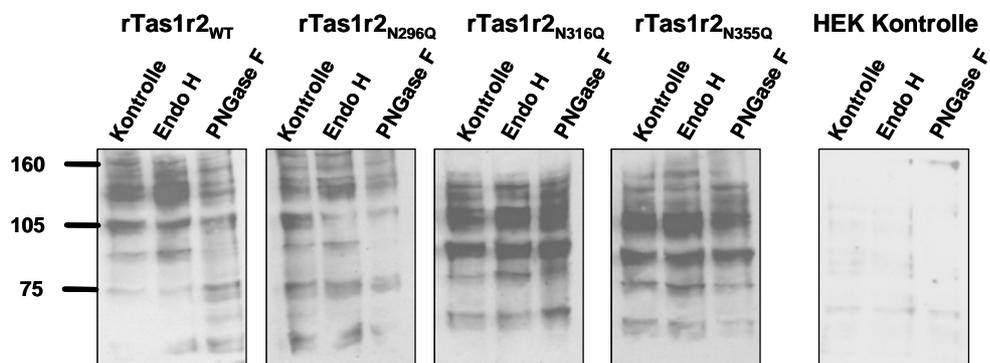


Abbildung 9: Behandlung von rekombinant überexprimiertem rTas1r2-HSV Wildtyp und seinen Mutanten mit den beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F.

Hierfür wurden HEK293 Zellen mit den verschiedenen rTas1r2 Mutanten (rTas1r2_{N296Q}, rTas1r2_{N316Q} und rTas1r2_{N355Q}) transient transfiziert und das Zell-Lysat anschließend mit der Endoglykosidase Endo H oder PNGase F behandelt. Der Nachweis der Rezeptormutanten erfolgte über ihre Epitop-Markierung mit einem Anti-HSV-Antikörper.

Als weiterer Vertreter der Subfamilie C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wurde rTrx/rGprc6a untersucht, der in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Schmale von N. Burhenne kloniert wurde (N. Burhenne, 2003). rTrx/rGprc6a besitzt in seinem N-Terminus neun potentielle N-Glykosylierungspositionen und eine weitere N-Glykosylierungsstelle in der zweiten extrazellulären Schleife. rTrx/rGprc6a wird wie mGprc6a an die Zellmembran transportiert und ist funktionell aktiv (persönliche Mitteilung v. P. Wellendorph; Kuang et al., 2005). Für mGprc6a wurde außerdem durch Behandlung von transfizierten HEK293 Zellen und nachfolgender PNGase F-Behandlung gezeigt, dass alle N-Glykosylierungspositionen benutzt werden (Kuang et al., 2005). hGPCR6A wird dagegen nicht zur Zellmembran transportiert (Wellendorph & Bräuner-Osborne, 2004).

In dieser Arbeit wurde nach Expression von rTrx/rGprc6a in HEK293-Zellen wurde das Lysat mit den Endoglykosidasen Endo H und PNGase F behandelt (siehe Kapitel 2.2.3.4) und mittels SDS-PAGE und Western Blot analy-

siert. Zum Nachweis des rTrx/rGprc6a wurde ein spezifischer Antikörper eingesetzt, der gegen seinen C-Terminus gerichtet ist (siehe Kapitel 2.1.4).

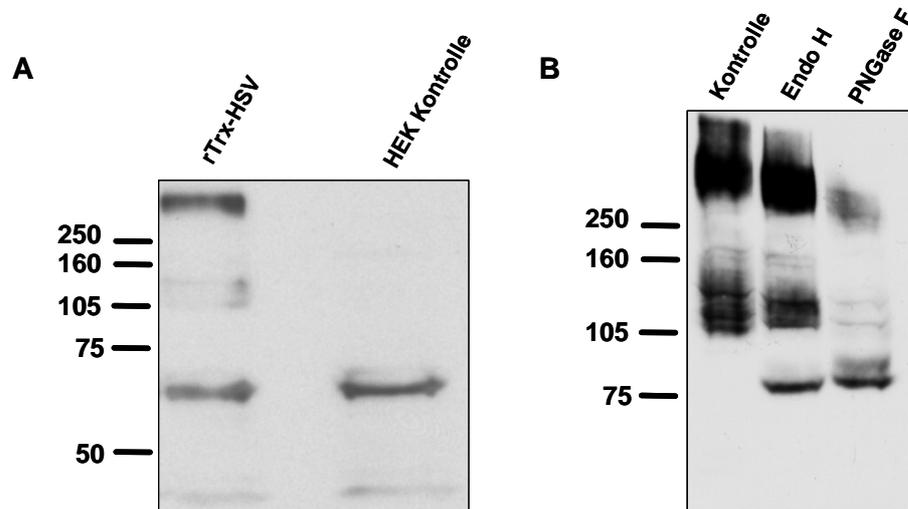


Abbildung 10: Behandlung von rekombinant überexprimierten rTrx/rGprc6a mit den beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F.

A: Nachweis von rTrx/rGprc6 mit einem spezifischen Antikörper. B: Endoglykosidasen-Behandlung von rTrx/rGprc6a und nachfolgenden immunologischen Nachweis mit einem spezifischen anti-rTRX-Antikörper. Die Endoglykosidasen-Behandlung zeigt, dass die oberen Banden zwischen 105 und 130 kDa Endo H resistent sind. Dies spricht dafür, dass rTrx/rGprc6a das ER verlässt und entlang des sekretorischen Weges transportiert wird.

In Abbildung 10 A ist die Spezifität des anti-TRX-Antikörpers gezeigt. In der linken Spur ist rTrx/rGprc6a-Lysat und rechts daneben untransfiziertes HEK293-Zell-Lysat aufgetragen. Deutlich sind in der linken Spur eine Bande bei ca. 300 kDa und drei schwächere Banden zwischen 105-130 kDa zu erkennen (besser zu sehen in Abbildung 10 B in der Kontrolle), die in der untransfizierten HEK293-Kontrolle nicht auftauchen. Die Banden bei ca. 60 und 40 kDa können auch in der Kontrolle detektiert werden und sind somit unspezifisch. Die Banden zwischen 105-130 kDa stellen unterschiedlich prozessierte Formen des Rezeptors dar. In Abbildung 10 B ist die Endoglykosidasen-Behandlung dargestellt. Die Inkubation des rTrx/rGprc6a-Lysates mit Endo H führt zu einer neuen Bande bei 75 kDa, wobei die oberen Banden zwischen 105 und 130 kDa Endo H resistent sind. Diese Banden verschwinden erst bei der Behandlung mit PNGase F. Die Bande bei ca. 300 kDa wird schwächer bei Behandlung mit PNGase F.

Im Gegensatz zu den Wildtypen und Mutanten von rTas1r2 und rTas1r3 konnte bei der Endoglykosidasen-Behandlung von rTrx/rGprc6a gezeigt werden, dass dieser Rezeptor mit Endo H sensitiven und Endo H resistenten Kohlenhydratketten modifiziert wurde. Dies spricht für einen Transport des rTrx/rGprc6a aus dem ER weiter zur Zelloberfläche entlang des sekretorischen Weges, wie auch die funktionellen Daten zeigen (persönliche Mitteilung v. P. Wellendorph). Aber auch wenn mit diesen hier durchgeführten Experimenten nur gezeigt werden konnte, dass rTas1r3 als Wildtyp wie auch seine N-Glykosylierungsmutanten nur mit mannosereichen Kohlenhydratketten modifiziert wurde, kann daraus nicht geschlossen werden, dass diese Rezeptoren nicht an die Plasmamembran transportiert werden. Die später in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Experimente (Kapitel 3.1.8) zeigen, dass zumindest ein Teil der Rezeptoren entlang des sekretorischen Weges zur Zellmembran transportiert worden sind. Ähnliches gilt auch für den rTas1r2 Wildtyp und seine N-Glykosylierungsmutanten.

3.1.3 Einfluss der Glykosylierung des Süßgeschmacksrezeptors auf seine Dimerisierung

Durch Expressionsstudien konnte gezeigt werden, dass der Süßgeschmacksrezeptor nur als Heterodimer aus Tas1R2 und Tas1R3 funktionell ist (Nelson et al., 2001). Für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Calcium *sensing*-Rezeptor, GABA_B-Rezeptor und metabotrope Glutamatrezeptoren) wurde berichtet, dass die N-Glykosylierung einen Einfluss auf die Dimerisierung hat. Es ist außerdem vorstellbar, dass dieser Einfluss nicht direkt ist, sondern dass die N-Glykosylierung die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cysteinen stabilisiert. Dies konnte durch Mutationsanalysen der Cysteine für den mGluR5 gezeigt werden (Romano et al., 2001).

Um den Einfluss der N-Glykosylierung auf die Dimerisierung der Untereinheiten des Süßgeschmacksrezeptors zu untersuchen, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente (Ko-IPs) durchgeführt. Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit pcDNA3-rTas1r2_{WT}-HSV und seinen verschiedenen Mutanten mit dem Wildtyp-Rezeptor pcDNA3-rTas1r3_{WT}-3xFLAG ko-transfiziert. Die beiden Rezeptoren sind jeweils mit verschiedenen C-terminalen Antikörper-Epitopen

versehen und können somit getrennt immunologisch detektiert werden. Die Zellen wurden 36 Stunden nach der Transfektion in Co-IP-Puffer lysiert und anschließend direkt zur Ko-Immünpräzipitation mit Anti-FLAG gekoppelter Agarose über Nacht eingesetzt. Nach wiederholten Waschschritten wurden die Proteinkomplexe durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und immunologisch im Western Blot mit Anti-HSV-Antikörper und Anti-FLAG-Antikörper detektiert. Hierfür wurden jeweils gleiche Mengen des Zell-Lysates (I), des Überstandes (Ü) nach Ko-IP und die Präzipitate (IP) auf zwei Gele aufgetragen.

In Abbildung 11 sind die Ergebnisse der Ko-Expression von rTas1r2_{WT} und seinen Rezeptormutanten mit dem rTas1r3_{WT} zusammengestellt. Dieses Experiment macht sichtbar, dass sich alle rTas1r2-Mutanten, mit der Ausnahme von rTas1r2_{N531Q}, mit dem rTas1r3_{WT} präzipitieren lassen (Abbildung 11 J). Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass die negative Ko-IP für das Rezeptorpaar rTas1r2_{N531Q} und rTas1r3_{WT} aufgrund schlechter Expression oder Degradation von rTas1r2_{N531Q} zustande kommt. Die Mutation N531Q liegt in der ca. 60 Aminosäuren umfassenden cysteinreichen Region des rTas1r2. Durch Mutationsanalysen der Cysteine beim humanen Calcium *sensing*-Rezeptor (hCaSR) konnte gezeigt werden, dass die Cysteine, die in der konservierten cysteinreichen Domäne liegen, für die Funktionalität des Rezeptors besonders kritisch sind. Es wird spekuliert, dass in diesem Bereich vielfältige intrazelluläre Disulfidbrücken ausgebildet werden, die wichtig sind beim ko-translationalen Faltungsprozess und der N-Glykosylierung (Fan et al., 1998).

Möglicherweise findet die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors auch über die Ausbildung von Disulfidbrücken in der cysteinreichen Domäne des Rezeptors statt oder aber die Faltung der cysteinreichen Domäne wird durch die fehlende Glykosylierung N 531 gestört, damit die korrekte Rezeptorfaltung verhindert und der Rezeptor abgebaut.

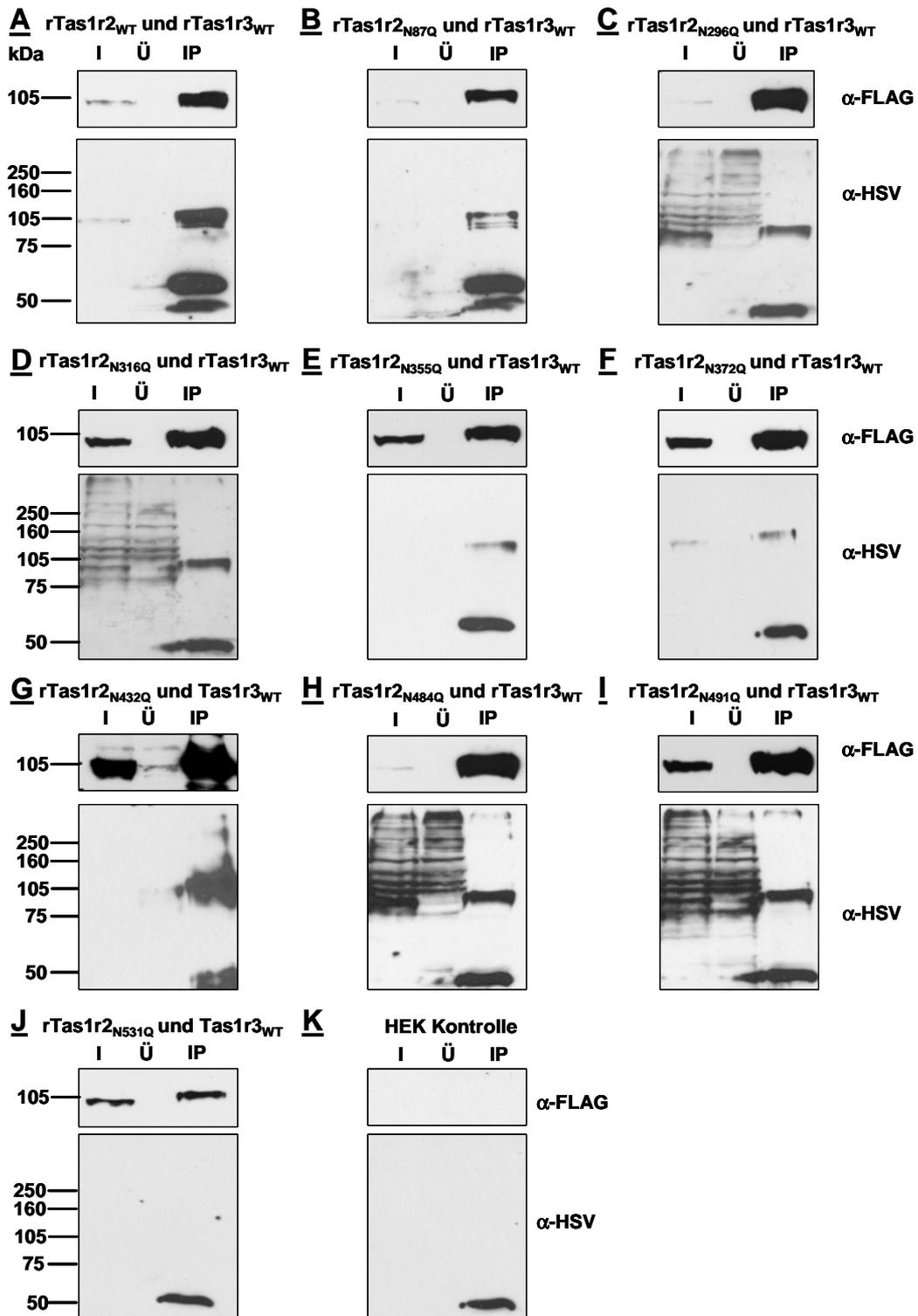


Abbildung 11: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r2-HSV Wildtyp und seinen Mutanten mit rTas1r3-3xFLAG Wildtyp.

Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den beiden Rezeptoren transfiziert und das Zell-Lysat mit einem Anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gebunden ist, präzipitiert. Input (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (IP) wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Anti-FLAG) am rTas1r3 bzw. das HSV-Epitop (Anti-HSV) am rTas1r2. Hier konnte gezeigt werden, dass alle rTas1r2-N-Glykosylierungsmutanten mit dem rTas1r3_{WT} interagierten, bis auf die Mutante rTas1r2_{N531Q} (J).

Außerdem zeigt rTas1r2, als Wildtyp bzw. auch als N-Glykosylierungsmutante, ein unterschiedliches Laufverhalten bei der SDS-PAGE in verschiedenen Experimenten. Bei schwacher Expression ist rTas1r2 in den Ko-IPs im Input und Überstand nicht nachweisbar, zeigt jedoch im Präzipitat eine Bande bei 105 kDa (wie in Abbildung 11 A, B, E, F, und G). Es ist genügend rTas1r3 (als Wildtyp oder Mutante) für eine erfolgreiche Dimerisierung im ER vorhanden und in diesen Fällen zeigt rTas1r2 ein normales Laufverhalten. Bei starker Expression von rTas1r2, wenn rTas1r2 also möglicherweise im Überschuss vorliegt (wie in Abbildung 11 C, D, H und I) und nicht genügend rTas1r3 für die Dimerisierung vorhanden ist, zeigen sich im Western Blot Banden im Input und im Überstand zwischen 100 und 300 kDa. Diese einzelnen Banden tauchen auch bei Einzeltransfektion von rTas1r2_{WT} bzw. seinen N-Glykosylierungsmutanten auf (siehe Abbildung 9). Die Banden stellen möglicherweise Aggregate aus mit sich selbst interagierenden rTas1r2 und unvollständige Glykosylierungsprodukte dar. In den meisten dieser Fälle ist im Input und im Überstand nur eine schwache Bande bei 105 kDa nachweisbar, die offenbar spezifisch mit rTas1r3 interagiert und ko-immunpräzipitiert wird. Es scheint, dass nur korrekt gefaltete rTas1r2-Mutanten mit rTas1r3_{WT} ko-immunpräzipitiert werden können, da wie in Abbildung 11 C, D, H und I die rTas1r2-Mutanten Überstand (Ü) nur eine schwache bzw. keine Bande bei 105 kDa zeigen. In diesen Fällen werden die weiteren im Western Blot detektierten Banden im Vergleich zum Input (I) nicht verändert.

Bei der Bande bei ca. 50 kDa handelt es sich um schwere Ketten des FLAG-Antikörpers, die nur über Disulfidbrücken an die kovalent an die Agarose gebundenen Ketten fixiert waren und durch Laemmli-Puffer abgelöst werden. Diese Bande taucht bei allen in diesem Kapitel zusammengestellten Ko-Immunpräzipitationsexperimenten (Abbildung 11-13) auf.

In Abbildung 11 K ist zusätzlich noch eine Ko-Immunpräzipitation von untransfizierten HEK293-Zellen aufgeführt. Hier ist zu sehen, dass die Präzipitation mit Anti-FLAG-gekoppelter Agarose nicht zu unspezifischen Banden führt. Gleichzeitig ist zu erkennen, dass beide eingesetzten Antikörper (Anti-HSV und Anti-FLAG) nicht zu unspezifischen Banden im Western Blot führen. Daraus

kann geschlossen werden, dass die in Abbildung 11 und Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse spezifisch sind und die positiven Ko-IPs mit einer Dimerisierung der Rezeptoren gleichzusetzen sind.

In Abbildung 12 ist das Experiment in umgekehrter Versuchsdurchführung dargestellt. Hier wurden HEK293-Zellen transient mit pcDNA3-rTas1r2_{WT}-HSV, mit dem pcDNA3-rTas1r3_{WT}-3xFLAG und seinen verschiedenen Mutanten ko-transfiziert. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, konnten alle Mutanten des rTas1r3 den rTas1r2_{WT} ko-immunpräzipitieren, mit den beiden Ausnahmen rTas1r3_{N85Q} (Abbildung 12 A) und rTas1r3_{N130Q} (Abbildung 12 B). Beide rTas1r3-Mutanten werden exprimiert und können mittels ihres FLAG-Epitops im Western Blot nachgewiesen werden. In beiden Ko-IP-Experimenten zeigt der rTas1r2_{WT} in den Gelspuren des Inputs und des Überstandes ein Laufverhalten, wie es schon bei alleiniger Expression von rTas1r2_{WT} gefunden wurde (siehe Abbildung 9). In allen anderen Ko-IP-Experimenten dieser Abbildung ist die Expression des rTas1r2_{WT} nur sehr schwach und somit nicht im Input (I) und Überstand (Ü), aber im Präzipitat nachweisbar und zwar als einzelne Bande bei 105 kDa.

Die N-Glykosylierungsmutante N 85 wird nur schwach in HEK293-Zellen exprimiert und kann somit nur im Präzipitat nachgewiesen werden. Möglicherweise ist diese Mutante nicht mehr stabil und wird abgebaut. Dies führt aufgrund der fehlenden Dimerisierung zu einer Destabilisierung des rTas1r2_{WT}. Dies ist sehr gut erkennbar an den Spuren des Inputs und des Überstandes, in denen rTas1r2_{WT} in vielen Banden detektiert wird. Für die zweite Glykosylierungsmutante rTas1r3_{N130Q} zeigt sich ein anderes Bild. Diese Mutation in dem Rezeptor führt nicht zu einer instabilen Rezeptormutante. Die Expression ist ungefähr mit dem Wildtyp vergleichbar (siehe Abbildung 8) und sie kann auch schon im Input detektiert werden. Hier trägt die fehlende Dimerisierung dennoch zu einer Destabilisierung des rTas1r2_{WT} und zu seiner Degradation bei.

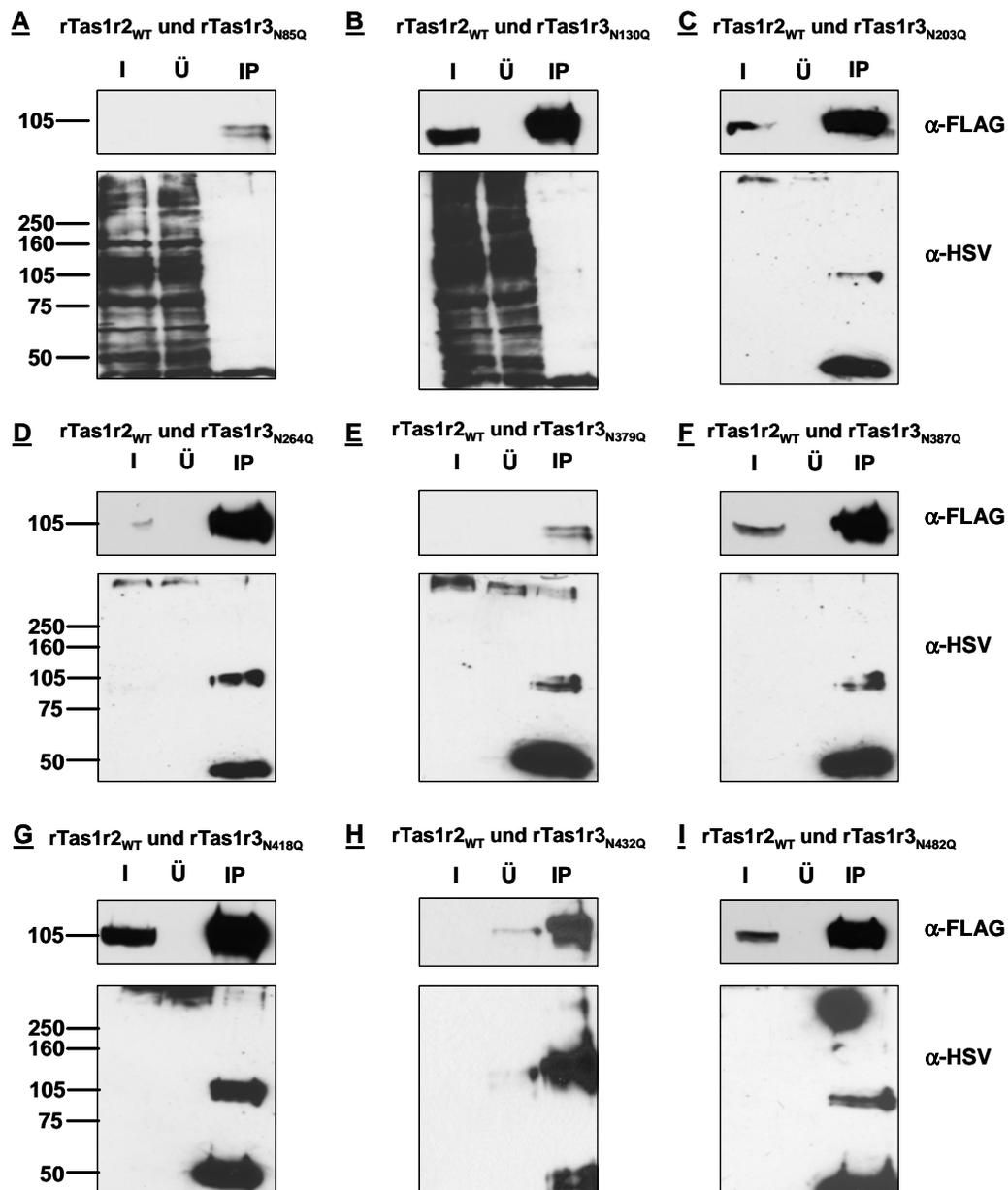


Abbildung 12: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r3-3xFLAG Wildtyp und seinen Mutanten mit rTas1r2-HSV Wildtyp.

Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den beiden Rezeptoren transfiziert und das Zell-Lysat mit einem Anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gebunden ist, präzipitiert. Input (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (IP) wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Anti-FLAG) für den rTas1r3 und das HSV-Epitop (Anti-HSV) für den rTas1r2. Es konnte gezeigt werden, dass alle rTas1r3-N-Glykosylierungsmutanten mit dem rTas1r2_{WT} interagierten, bis auf die Mutanten rTas1r3_{N85Q} (A) und rTas1r3_{N130Q} (B).

Beide N-Glykosylierungspositionen N 85 und N 130 befinden sich in einem Bereich des Rezeptors, in dem beim mGluR5 und dem hCaSR angenommen wird, dass kovalente Dimerisierung über Disulfidbrücken stattfindet. Hier befinden sich drei konservierte Cysteinreste (C 57, C 99 und C 129). Mutationsanalysen

für den mGluR5 und den hCaSR haben gezeigt, dass die Mutation C129S die Dimerisierung über kovalente Bindungen der Rezeptoren verhindert (Romano et al., 2001; Ray et al., 1999). Diese kovalente Dimerisierung findet beim Süßgeschmacksrezeptor möglicherweise auch über diesen Teil des Rezeptors statt. Die Mutation der N-Glykosylierungspositionen in unmittelbarer Nähe dieser Bindung verhindert offenbar die Interaktion mit rTas1r2_{WT} und führt zur Destabilisierung oder Aggregation des rTas1r2_{WT} wie es schon bei alleiniger Expression des rTas1r2 Rezeptors (Wildtyp oder N-Glykosylierungsmutanten) beobachtet wurde. Die N-Glykosylierungsstelle bei N 130 ist auch im hCaSR vorhanden, wobei nur seine N-Glykosylierung im Zusammenhang mit der Zelloberflächenexpression und Signaltransduktion untersucht worden ist und nicht im Zusammenhang mit der Dimerisierung (Ray et al., 1998). rTas1r2 besitzt in diesem N-terminalen Abschnitt keine potentielle N-Glykosylierungsposition.

In Abbildung 13 sind Kontrollen zusammengestellt, die in Zusammenhang mit den hier gezeigten Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt worden sind. Für den Western Blot in Abbildung 13 A wurden HEK293-Zellen transient mit rTas1r2_{WT}-HSV transfiziert und es wurde versucht diesen mit Anti-FLAG-Antikörper, kovalent gebunden an Agarose, zu präzipitieren. Der Rezeptor bindet nicht unspezifisch an die verwendete Agarose. Im Western Blot zeigen sich nur Banden im Input (I) und Überstand (Ü) mit einem Anti-HSV-Antikörper. Mit einem Anti-FLAG-Antikörper können keine unspezifischen Banden detektiert werden. In Abbildung 13 B ist ein Western Blot abgebildet, für den HEK293-Zellen transient mit rTas1r2_{WT}-HSV transfiziert worden sind. Die Immunpräzipitation wurde mit unspezifischen IgGs, die an Protein A Agarose gebunden worden sind, durchgeführt. rTas1r2_{WT}-HSV kann nicht durch diese unspezifischen IgGs präzipitiert werden (keine Bande in der IP), im Input (I) und Überstand (Ü) lässt sich rTas1r2_{WT}-HSV mit dem HSV-Antikörper jedoch nachweisen. Mit einem Anti-FLAG-Antikörper sind, wie Abbildung 13 A, keine unspezifischen Banden erkennbar. Gleiches gilt auch für rTas1r3_{WT}-3xFLAG nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen, wenn er mit unspezifischen IgGs, die an Protein A Agarose gebunden worden sind, versucht wurde zu präzipitieren. Auch hier sind mit einem Anti-FLAG-Antikörper nur spezifische Banden im Input (I) und

Überstand (Ü) und keine Banden im Präzipitat nachweisbar (siehe Abbildung 13 C).

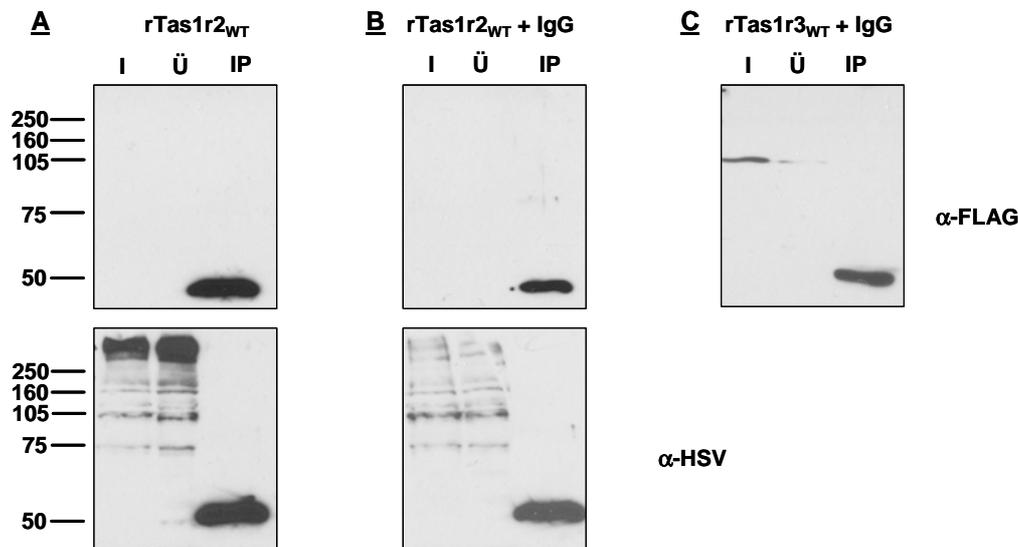


Abbildung 13: Kontroll-Experimente zur Überprüfung der Spezifität der durchgeführten Ko-Immunpräzitationen

Nach transienter Transfektion des rTas1r3_{WT}-3xFLAG bzw. rTas1r2_{WT}-HSV in HEK293-Zellen und anschließender Immunpräzitation mit unspezifischen IgGs, die an Protein A Agarose gebunden sind (B und C) bzw. Anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gekoppelt ist (A), wurden die Proteine aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert.

A: rTas1r2_{WT} konnte mit einem Anti-HSV-Antikörper im Input (I) und Überstand (Ü) nachgewiesen werden. Es konnten keine unspezifischen Banden mit einem anti-FLAG-Antikörper detektiert werden. B: rTas1r2_{WT} wurde nur im Input und Überstand nachgewiesen, es sind keine Banden im Präzipitat (IP) und mit einem anti-FLAG-Antikörper nachzuweisen. C: rTas1r3_{WT} ist im Input und Überstand nachzuweisen, bindet jedoch nicht unspezifisch an IgGs.

Zusammenfassend kann aus diesen Ko-IP-Experimenten abgeleitet werden, dass die N-Glykosylierung in den meisten Fällen keine Auswirkung auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors hat. Es scheint aber, dass die N-Glykosylierungsposition bei N 531 im rTas1r2 und die N-Glykosylierungsstellen N 85 und N 130 im rTas1r3 für die Dimerisierung von Bedeutung sind.

3.1.4 Einführung einer zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle im rTas1r3 an der Position N 58

Genetische Studien zeigen, dass es verschiedene Mausstämme gibt, die sich in ihrer Prävalenz gegenüber süßschmeckenden Verbindungen unterscheiden („Schmecker“ und „Nicht-Schmecker“). In diesen Studien konnte dargestellt werden, dass es 15 Polymorphismen auf Nukleinsäureebene gibt, von denen sieben zu Aminosäure-Veränderungen im mTas1r3 führen (die anderen be-

finden sich in intronischen Bereichen oder sind stille Mutationen). Es gibt jedoch nur zwei, die sich in „Schmeckern“ und „Nicht-Schmeckern“ unterscheiden: T55A und I60T (hintere AS steht für „Nicht-Schmecker“). Der zweite Aminosäureaustausch führt zu einer neuen potentiellen N-Glykosylierungsstelle im N-Terminus des mTas1r3 (Max et al., 2001).

Um das Verhalten dieser Rezeptormutante rTas1r3₊₅₈ in Bezug auf seine Dimerisierung untersuchen zu können, wurde in das Ausgangsplasmid pcDNA3-rTas1r3_{WT}-3xFLAG mit Hilfe der gerichteten Mutagenese eine zusätzliche Glykosylierungsstelle eingeführt. Hierfür wurden Oligonukleotide (f, r) generiert, die das an dieser Position befindliche Isoleucin in ein Serin an der Position 60 mutieren. Die Überprüfung der Mutation erfolgte mittels Sequenzierung.

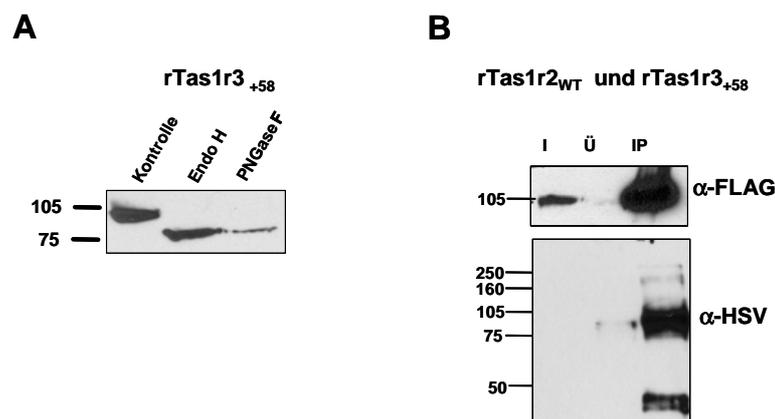


Abbildung 14: Endoglykosidasen-Behandlung rTas1r3₊₅₈-3xFLAG und Ko-Immünpräzipitation von rTas1r3₊₅₈-3xFLAG mit rTas1r2_{WT}-HSV.

A: Nach transienter Transfektion von HEK293-Zellen mit rTas1r3₊₅₈-3xFLAG und nachfolgender Endoglykosidasen-Behandlung des Zell-Lysates, wurde die Rezeptor-Mutante über ihre Epitop-Markierung mit einem Anti-FLAG-Antikörper nachgewiesen. B: Hierfür wurden HEK293-Zellen mit den beiden Rezeptoren ko-transfiziert und das Zell-Lysat mit einem Anti-FLAG-AK, der kovalent an Agarose gebunden ist, präzipitiert. Input (I), Überstand (Ü) und Präzipitat (IP) wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Anti-FLAG) und das HSV-Epitop (Anti-HSV). Die zusätzlich eingeführte N-Glykosylierungsstelle N 58 verhindert nicht die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors.

In Abbildung 7 ist ein Größenvergleich der verschiedenen klonierten rTas1r3_{WT} und Rezeptormutanten gezeigt. Das etwas erhöhte Molekulargewicht gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor zeigt, dass die neu eingeführte N-Glykosylierungsstelle N 58 verwendet wird. In Abbildung 14 A ist das Ergebnis der Endoglyko-

sidasen-Behandlung, die wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde, auf rTas1r3₊₅₈ gezeigt. Die Rezeptormutante wird erfolgreich in das ER transloziert, jedoch ebenfalls nicht weiter in den Golgi-Apparat transportiert, wie die Endo H Sensitivität zeigt. Ein Teil dieser Mutante wird jedoch zur Zellmembran transportiert, wie die funktionellen Experimente (Kapitel 3.1.8) zeigen.

In Abbildung 14 B ist das Ergebnis der Ko-Immunpräzipitation, die wie zuvor beschrieben durchgeführt wurde, dargestellt. Nach erfolgter Ko-IP lassen sich beide Rezeptoren, rTas1r2_{WT} und rTas1r3₊₅₈ im Präzipitat nachweisen. Die Einführung einer zusätzlichen N-Glykosylierungsstelle durch Mutation von I60T führt nicht dazu, dass die Dimerisierung zwischen rTas1r2_{WT} und rTas1r3₊₅₈ beeinflusst wird.

3.1.5 Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors

Beim Süßgeschmacksrezeptor ist eine Heterodimerisierung für seine Funktionalität essentiell, dies wurde ausführlich in Ligandenbindungsstudien in einem heterologen Expressionssystem behandelt (Nelson et al., 2001).

N. Burhenne (2003) konnte im Hefe-System zeigen, dass die Heterodimerisierung nicht über die C-terminale Domäne der Rezeptoren vermittelt wird. Außerdem konnte durch Sequenzvergleiche festgestellt werden, dass die monomeren C-terminalen Domänen von rTas1r2 und rTas1r3 nicht über eine α -Helix verfügen, die für eine Dimerisierung mittels einer parallelen coiled-coil α -Helix-Struktur benötigt wird, so wie es für den GABA_BR1 beschrieben wurde (Kammerer et al., 1999).

Um den Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors in einem heterologen Zellkultursystem zu untersuchen, wurden C-terminal verkürzte Rezeptormutanten kloniert. Hierfür wurden die jeweiligen Ausgangsplasmide pcDNA3-rTas1r2_{WT}-HSV und pcDNA3-rTas1r3_{WT}-3xFLAG an der C-terminalen Domäne deletiert. Die neu entstandenen Plasmide enthalten noch die vollständige siebte Transmembrandomäne und einen konservierten Teil der C-terminalen Domäne (rTas1r2_{WT} nt 1-2481; rTas1r3_{WT} nt 1-

2493). Die Überprüfung der neu entstandenen Konstrukte erfolgte mit Hilfe von Sequenzierungen.

Für die Untersuchung der Dimerisierung dieser Mutanten mit den Wildtyprezeptoren wurden HEK293-Zellen transient mit pcDNA3-rTas1r2_{WT}-HSV und pcDNA3-rTas1r3 Δ C-3xFLAG bzw. umgekehrt der pcDNA3-rTas1r2 Δ C-HSV und pcDNA3-rTas1r3_{WT}-3xFLAG ko-transfiziert und die Ko-Immunpräzipitation wie unter Kapitel 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 15 A ist das Resultat der Ko-IP aus rTas1r2_{WT} mit rTas1r3 Δ C aufgeführt. rTas1r3 Δ C ist nur schwach im Input (I) und Überstand (Ü), dafür aber angereichert im Präzipitat (IP) detektierbar. rTas1r2_{WT} konnte sehr gut im Input, Überstand und Präzipitat nachgewiesen werden und zwar mit einem Molekulargewicht von 250-300 kDa. Diese Bande wurde schon in Kapitel 3.1.3 diskutiert. Es ist jedoch auch schwach eine Bande mit dem korrekten Molekulargewicht von 105 kDa im Präzipitat detektierbar. Durch den Nachweis beider Rezeptoren im Präzipitat kann davon ausgegangen werden, dass die Rezeptoren dimerisieren. In Abbildung 15 B ist das umgekehrt durchgeführte Experiment dargestellt. Auch hier ist der rTas1r3_{WT} im Input (I) und Präzipitat (IP) detektierbar. Im unteren Teil der Abbildung wird der Nachweis von rTas1r2 Δ C erbracht. Es sind wieder Banden mit einem Molekulargewicht von 250-300 kDa im Input (I), Überstand (Ü) und Präzipitat (IP) zu erkennen. Im Präzipitat (IP) ist wieder eine Bande bei 105 kDa zu detektieren.

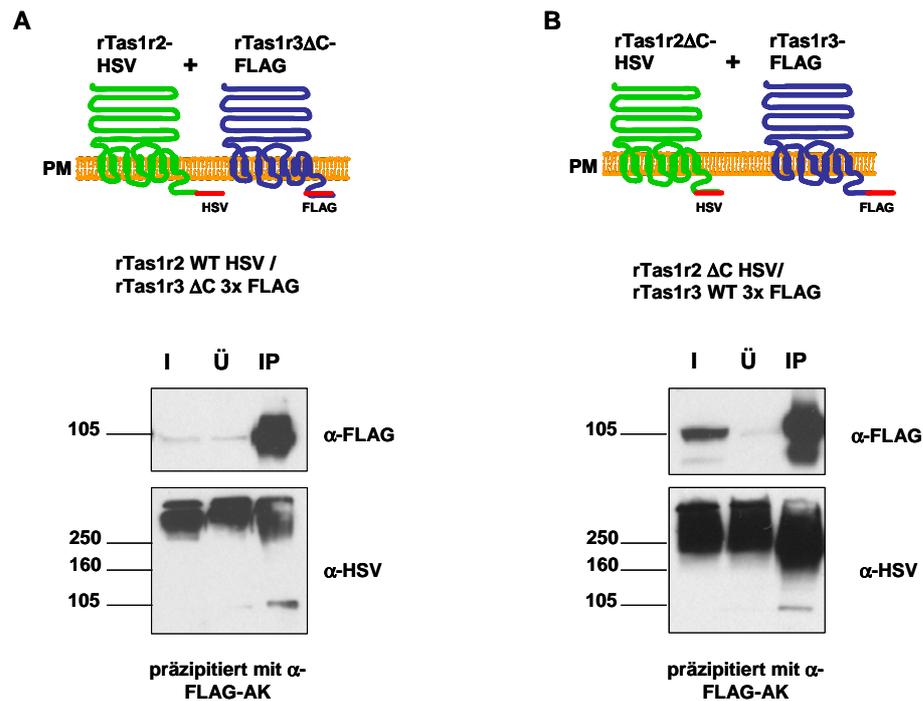


Abbildung 15: Ko-Immünpräzipitation von rTas1r2_{WT}-HSV Wildtyp mit rTas1r3ΔC-3xFLAG (A) bzw. rTas1r2 ΔC-HSV mit rTas1r3_{WT}-3xFLAG Wildtyp (B), um den Einfluss des C-Terminus auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors zu zeigen.

Nach transients Transfektion von HEK293-Zellen wurde die Präzipitation mit Anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gebunden ist, durchgeführt. Input (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (IP) wurden im Western Blot analysiert. Die Detektion der rekombinant exprimierten Rezeptoren erfolgte über ihre C-terminalen Epitop-Markierungen. Für rTas1r2_{WT}, rTas1r2ΔC mit einem Anti-HSV-Antikörper und für rTas1r3_{WT}, rTas1r3ΔC mit einem Anti-FLAG-Antikörper. A: Ko-IP aus Zell-Extrakt mit den rekombinant exprimierten rTas1r2_{WT} mit der C-terminalen Deletionsmutante rTas1r3ΔC. B: Ko-IP aus Zell-Extrakt mit der rekombinant exprimierten C-terminalen Deletionsmutante rTas1r2ΔC mit dem rTas1r3_{WT}. In beiden Fällen konnte mit Hilfe der Ko-IP eine Dimerisierung der Rezeptoren nachgewiesen werden. Daraus lässt sich folgern, dass die Dimerisierung nicht über den C-Terminus vermittelt wird.

Aus den Experimenten, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, kann abgeleitet werden, dass die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors nicht über seine C-terminale Domäne erfolgt. Es konnten die zuvor gefundenen Ergebnisse aus dem Hefe-System in einem heterologen Zellkulturexpressionssystem bestätigt werden.

3.1.6 Intrazelluläre Lokalisierung der Rezeptoren rTas1r2, rTas1r3 und ihrer C-terminal verkürzten Mutanten

Die intrazelluläre Lokalisierung des rTas1r2_{WT}, rTas1r3_{WT} und ihrer C-terminal verkürzten Mutanten sollte auch durch Ko-Lokalisationsexperimente mit Marker-

Proteinen für intrazelluläre Kompartimente (Endoplasmatisches Retikulum [ER] und Golgi-Komplex) gezeigt werden. Hierfür wurden die verschiedenen Rezeptorkonstrukte (rTas1r2_{WT}-HSV, rTas1r3_{WT}-3xFLAG, rTas1r2 Δ C-HSV und rTas1r3 Δ C-3xFLAG) jeweils einzeln transient in HEK293-Zellen transfiziert. Die immunzytochemische Detektion erfolgte für rTas1r2_{WT} und rTas1r2 Δ C über das HSV-Epitop mit einem primären HSV-Antikörper und für rTas1r3_{WT} und rTas1r3 Δ C über das FLAG-Epitop mit einem FLAG-Antikörper. Als Zweitantikörper wurde ein Alexa488-konjugierter Antikörper eingesetzt. Die endogenen Markerproteine Calnexin für das ER und GM-130 für den cis-Golgi Komplex wurden mit spezifischen primären Antikörpern und einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes.

In Abbildung 16 A ist zu sehen, dass rTas1r2_{WT} eine vesikuläre Verteilung innerhalb der Zelle zeigt und eine allenfalls schwache Lokalisation an der Plasmamembran nachzuweisen ist. Dies ist auch durch seine Ko-Lokalisierung mit dem ER-Marker Protein Calnexin zu sehen. Des Weiteren konnte eine teilweise eine Ko-Lokalisierung mit dem *cis*-Golgi-Marker GM-130 detektiert werden. In Abbildung 16 B ist die zelluläre Verteilung von rTas1r3_{WT} zu sehen. Auch hier ist keine Plasmamembranlokalisierung nachzuweisen, sondern eine hauptsächlich vesikuläre Verteilung innerhalb der Zelle, was auf eine erhöhte Konzentration im ER hinweist. Das wird auch durch die Ko-Lokalisierung mit Calnexin bestätigt. Für den rTas1r3_{WT} lässt sich teilweise eine Ko-Lokalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM-130 nachweisen.

Obwohl die Zellmembranlokalisierung und die Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Marker sehr schwach sind, zeigen die funktionellen Experimente jedoch, dass die Rezeptoren zu einem geringen Prozentsatz zur Zellmembran transportiert worden sind.

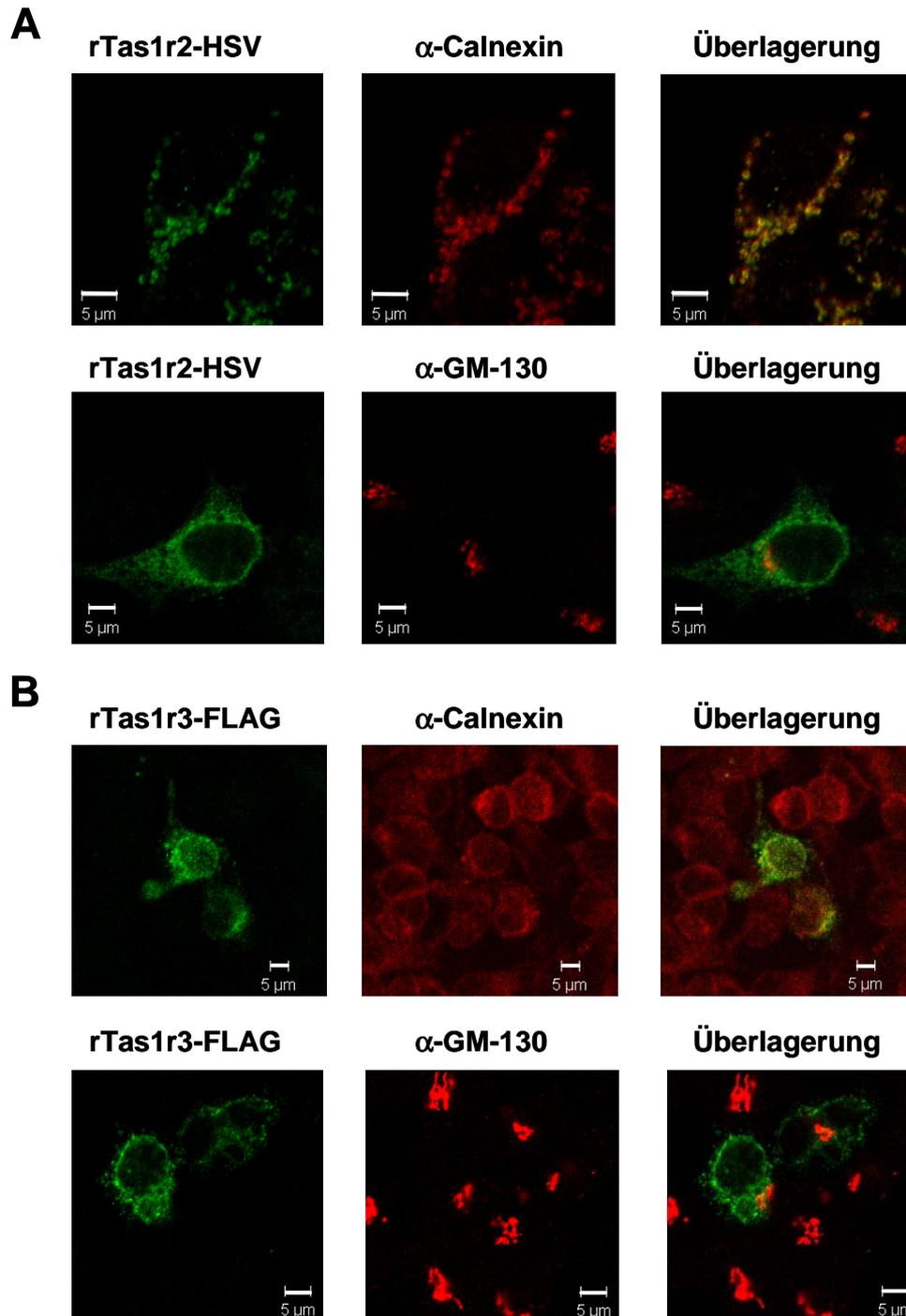


Abbildung 16: Zelluläre Lokalisierung von rekombinant exprimiertem rTas1r2-HSV und rTas1r3-3xFLAG in HEK293-Zellen mit dem ER-Marker Calnexin und dem *cis*-Golgi-Marker GM130.

Hierfür wurden HEK293-Zellen transient mit rTas1r2_{WT}-HSV und rTas1r3_{WT}-3xFLAG einzeln transfiziert, immunzytochemisch analysiert und die Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. A: Der rTas1r2_{WT}-HSV (grün) ist im Zytoplasma in vesikulären Strukturen nachzuweisen und ko-lokalisiert mit Calnexin (rot, gelb in der Überlagerung) und auch teilweise mit GM-130. B: Eine ähnliche Lokalisation ist auch für den rTas1r3_{WT}-FLAG (grün) nachweisbar, es gibt jedoch nur eine schwache Ko-Lokalisation mit GM-130 (rot). Es zeigt sich aber eine Ko-Lokalisation mit Calnexin (rot, gelb in der Überlagerung) mit rTas1r3_{WT}. Skalierungsbalken: 5 μ m

In Abbildung 17 A ist die Lokalisierung des rTas1r2 Δ C in vesikulären Strukturen (Endoplasmatische Retikulum oder Golgi-Komplex) in den HEK293-Zellen zu sehen und es zeigt sich wiederum nur eine allenfalls schwache Plasmamembranlokalisierung. Der C-terminal verkürzte Rezeptor wird ins Endoplasmatische Retikulum transloziert, aber nicht besser zur Zelloberfläche transportiert. Gleichzeitig ist auch eine Ko-Lokalisation mit dem ER-Marker Protein Calnexin zu erkennen. Nur eine sehr schwache Ko-Lokalisation ist mit GM-130 nachzuweisen. Abbildung 17 B stellt die intrazelluläre Lokalisierung des rTas1r3 Δ C dar. Auch hier zeigt sich eine vesikuläre Verteilung von rTas1r3 Δ C in der Zelle und eine schwache Ko-Lokalisation mit dem ER-Chaperon Calnexin. Es ist nur eine schwache Ko-Lokalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM-130 zu sehen. Dies weist daraufhin, dass der rTas1r3 Δ C im ER angereichert vorliegt.

Zusammenfassend kann beobachtet werden, dass die C-terminal verkürzten Rezeptoren in HEK293-Zellen, wenn sie jeweils unabhängig voneinander transfiziert werden, nur eine partielle Plasmamembranlokalisierung aufweisen und eine deutliche Ko-Lokalisation mit dem ER-Marker Calnexin zeigen. Gleichzeitig ergab sich für rTas1r2 Δ C und rTas1r3 Δ C, dass keine eindeutige Ko-Lokalisation mit dem *cis*-Golgi-Marker GM-130 vorlag, was vermuten lässt, dass die C-terminal verkürzten Rezeptoren nur schlecht aus dem ER in den Golgi-Komplex transportiert werden.

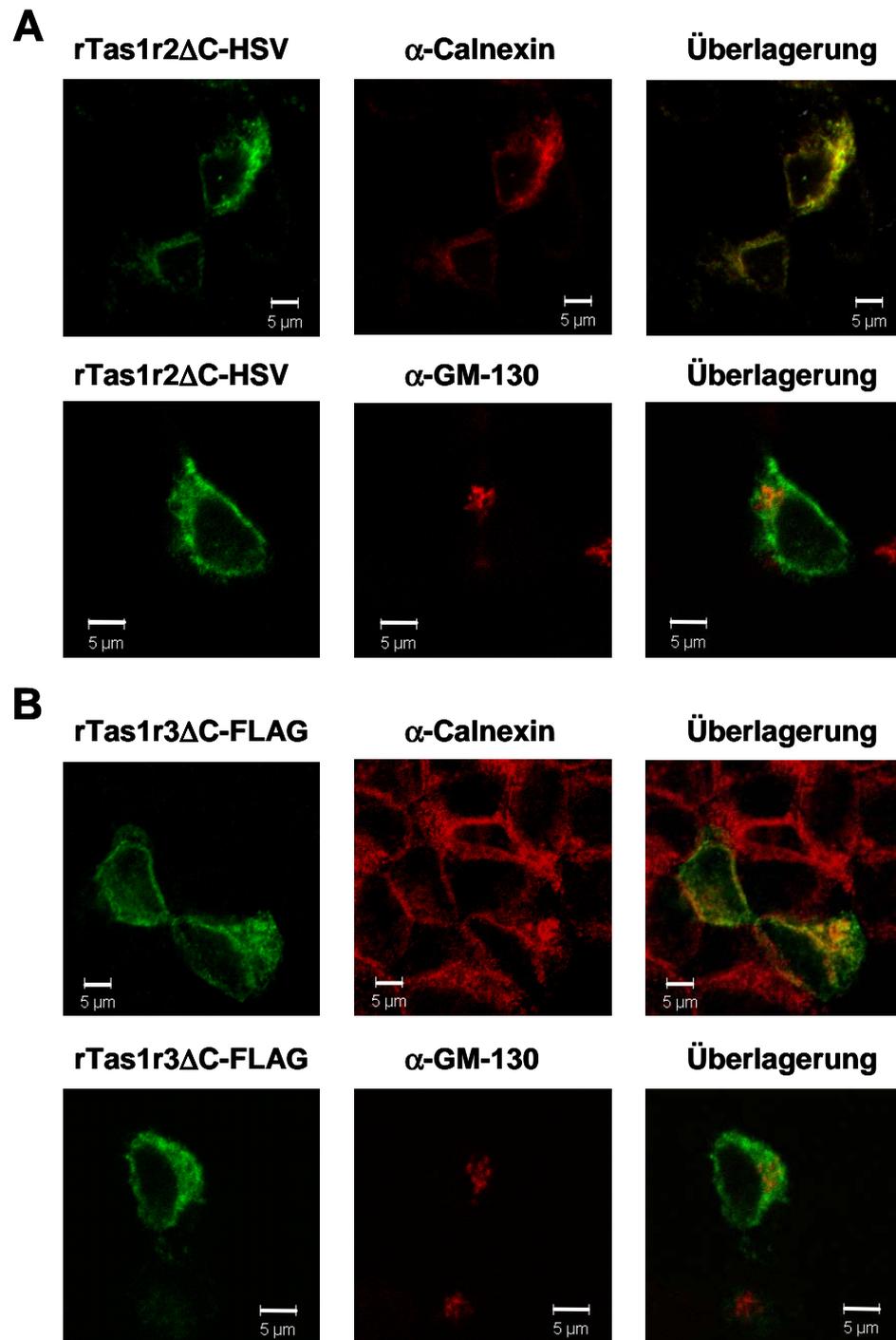


Abbildung 17: Ko-Lokalisation von rTas1r2 Δ C-HSV und rTas1r3 Δ C-3xFLAG in HEK293-Zellen mit dem ER-Marker Calnexin und dem *cis*-Golgi-Marker GM-130.

Die Lokalisierung der einzeln rekombinant überexprimierten Rezeptoren rTas1r2 Δ C-HSV und rTas1r3 Δ C-3xFLAG nach Transfektion in HEK293-Zellen wurden immunzytochemisch analysiert und die Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. A: Der rTas1r2 Δ C (grün) liegt in einer vesikulären Struktur im ER vor, dies erkennt man an der Ko-Lokalisation mit dem ER-Marker Calnexin (rot, erkennbar an der Gelbfärbung in der Überlagerung), außerdem ist eine schwache Ko-Lokalisation mit GM-130 (rot) festzustellen. B: Der rTas1r3 Δ C (grün) liegt in einer vesikulären Struktur vor, dies erkennt man an der Ko-Lokalisation mit dem ER-Marker Calnexin (rot, gelb in der Überlagerung) und einer teilweisen Ko-Lokalisation mit GM-130 (rot). Skalierungsbalken: 5 μ m

3.1.7 Ko-Immunpräzipitation des Süßgeschmacksrezeptors aus einer den Rezeptor stabil exprimierenden Zell-Linie mit Marker-Proteinen

Um die Lokalisierung des Süßgeschmacksrezeptors näher zu untersuchen, wurde die von Marcel Winnig (DIfE [Deutsches Institut für Ernährungsforschung], Potsdam) hergestellte stabile Flp-In-293 Zell-Linie, die die beiden Rezeptoren rTas1r2-FLAG und rTas1r3-HSV stabil exprimiert, verwendet. Von dieser Zell-Linie, die in funktionellen Experimenten zur Untersuchung der Ligandenvermittelten Rezeptoraktivierung messbare Signale zeigt, war immunzytochemisch für diese Rezeptoren nur eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisierung erkennbar (N.Burhenne, M.Winnig).

Mit dieser Zell-Linie wurden die in Abbildung 18 dargestellten Ko-Immunpräzipitationsexperimente nach Kapitel 2.2.3.3 durchgeführt. Die endogenen ER-Marker Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert.

Die beiden Rezeptoren rTas1r2_{WT}-FLAG und rTas1r3_{WT}-HSV konnten im Input, Überstand und Präzipitat (rTas1r3) und im Input und Präzipitat (rTas1r2) nachgewiesen werden, wie in Abbildung 18 B dargestellt. Außerdem ist zu erkennen, dass rTas1r2 auch mit einem anderen Antikörper Epitop (hier Anti-FLAG) sein Verhalten in der SDS-PAGE nicht ändert. Auch in dieser Abbildung ist eine Bande bei 250-300 kDa und eine Bande bei 105 kDa zu sehen. Hier ist jedoch bei 105 kDa eine sehr viel stärkere Bande zu erkennen als in den anderen Ko-IP-Experimenten. Dies liegt möglicherweise an der sehr viel effektiveren direkteren Bindung an die Agarose über das FLAG-Epitop und an der deutlich höheren Expression von rTas1r2 in der stabilen Zell-Linie im Vergleich zur transienten Transfektion.

In Abbildung 18 C ist das endogene zytosolische Protein HSP 70 (*heat-shock protein 70*) im Input (I) und Überstand (Ü) der Ko-IP mit dem Süßgeschmacksrezeptor nachgewiesen worden. HSP 70 konnte jedoch nicht im Präzipitat detektiert werden. HSP 70 ist ein zytosolisches Chaperon, welches mit Proteinen interagiert, die im Zytosol vorliegen, oder das mit den Rezeptorbereichen (in diesem Fall den C-terminalen Domänen der Rezeptoren), die außerhalb der

ER-Membran liegen, interagiert. Die Interaktion konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Für den Angiotensin II Rezeptor (Subtyp I) konnte die Interaktion mit HSP 70 durch Ko-IP-Experimente belegt werden. (Lanctot et al., 2005; 2006).

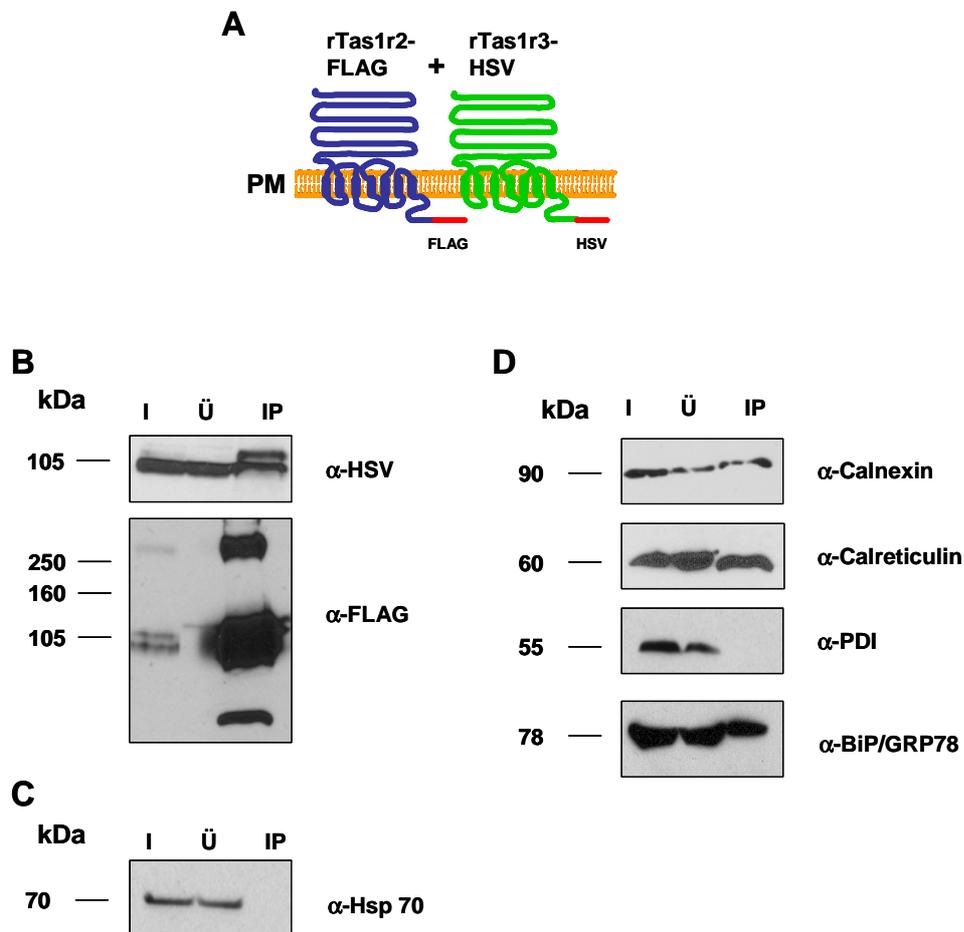


Abbildung 18: Ko-Immünpräzipitation von rTas1r2-FLAG und rTas1r3-HSV mit verschiedenen Marker-Proteinen.

In HEK293-Zellen wurden die rekombinant überexprimierten rTas1r2-FLAG und rTas1r3-HSV mit einem Anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gebunden ist, präzipitiert. Input (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (IP) wurden mit den angegebenen Antikörpern im Western Blot analysiert. A: Schematische Darstellung von rTas1r2-FLAG und rTas1r3-HSV. B: Nachweis der beiden Rezeptoren im Input, Überstand und IP. C: Das zytosolische Chaperon HSP 70 (*heatshock protein 70*) konnte nach der Ko-IP nur im Input (I) und Überstand (Ü) nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich keine Bande im Präzipitat. Daraus kann gefolgert werden, dass HSP 70 nicht mit dem Süßgeschmacksrezeptor interagiert. D: Hier konnte der Nachweis erbracht werden, dass die ER-Marker Calnexin, Calreticulin und BiP/GRP78 (*immunoglobulin heavy chain binding protein/glucose regulated protein 78*) eine Interaktion mit dem Süßgeschmacksrezeptor zeigen, jedoch der Süßgeschmacksrezeptor nicht mit PDI (Proteindisulfid-Isomerase) interagiert.

Abbildung 18 D zeigt die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation des Süßgeschmacksrezeptors rTas1r2 und rTas1r3 mit den endogen exprimierten ER-Marker Proteinen Calnexin, Calreticulin, PDI (Proteindisulfid-Isomerase) und BiP/GRP78 (*immunoglobulin heavy chain binding protein/glucose regulated protein 78*). Alle Proteine lassen sich im Input (I) und Überstand (Ü) als Bande detektieren, im Präzipitat lassen sich jedoch nur Calnexin, Calreticulin und BiP/GRP78 nachweisen. Calnexin und Calreticulin gehören zu den ER-Chaperonen, die an der Qualitätskontrolle des ERs beteiligt sind. Beide Proteine binden bevorzugt an monoglukosylierte Proteine. BiP/GRP78 bindet bevorzugt an nicht vollständig gefaltete Proteine, um diese in einem Zustand zu halten, der die korrekte Faltung unterstützt (Schröder & Kaufmann, 2005). Außerdem wird die Expression von BiP/GRP78 verstärkt im Zusammenhang mit Stressreaktionen, wie sie während des *unfolded protein response* (UPR) auftreten, in Verbindung gebracht. PDI zeigt keine Interaktion mit dem Süßgeschmacksrezeptor. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass im Zusammenspiel von Calnexin und Calreticulin eine andere Proteindisulfid-Isomerase ERp57 eine größere Rolle spielt als PDI.

Zusammenfassend kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, dass die Rezeptoren rTas1r2_{WT} und rTas1r3_{WT} nicht vollständig an die Plasmamembran transportiert werden, sondern in intrazellulären Kompartimenten (ER und Golgi-Komplex) verbleiben. Dies konnte durch Ko-Immunpräzipitationen gezeigt werden, in denen der Süßgeschmacksrezeptor als Heterodimer exprimiert wurde (Abbildung 18) und in denen auch verschiedene ER-Marker Proteine (Calnexin, Calreticulin, BiP/GRP 78) präzipitiert werden konnten. Die drei ER-Marker BiP/GRP 78, Calnexin und Calreticulin gehören zum Kontrollsystem des ERs. Dabei bindet BiP/GRP78 an unreife Proteine. Die beiden anderen ER-Chaperone dienen durch ihre Bindung als Signal für eine nicht abgeschlossene Faltung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur.

3.1.8 Funktionelle Untersuchungen an den Mutanten des rTas1r2 und rTas1r3 im FLIPR

Um die während dieser Arbeit klonierten verschiedenen Rezeptormutanten (N-Glykosylierungsmutanten, C-terminal deletierte Rezeptormutanten) unter funktionellen Bedingungen zu untersuchen, wurden in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Institut für Ernährungsforschung (M. Winnig, Prof. W. Meyerhof) Experimente im FLIPR (**F**luorescence **I**maging **P**late **R**eader) durchgeführt.

Im FLIPR kann die Rezeptoraktivierung nach Ligandengabe über Ca^{2+} -bindende Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Bei diesen Experimenten wurde als Fluorochrom das Fluo-4-AM (AM: Acetoxymethylester) verwendet, wobei die AM-Gruppe dem Farbstoff die Membrangängigkeit verleiht und in der Zelle durch Esterasen abgespalten wird. Der Farbstoff liegt dann in freier Form vor und kann freies Ca^{2+} detektieren.

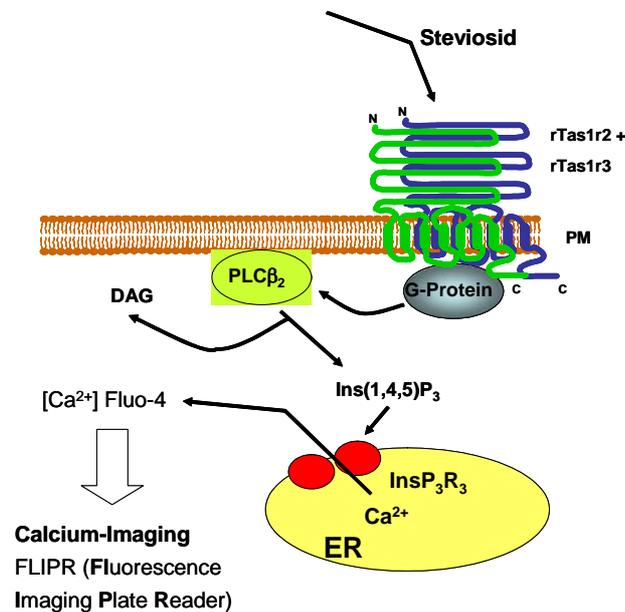


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Signalweges von rTas1r2 und rTas1r3 nach Liganden vermittelter Aktivierung im heterologen Expressionssystem.

Nach Aktivierung durch einen Liganden leitet der Süßgeschmacksrezeptor das Signal über die an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle ($G_{\alpha 16\text{gust}44}$, PLC β_2 , IP $_3$) weiter. Nach der Freisetzung von Ca^{2+} bildet sich ein Chelatkomplex mit dem Fluorochrom (Fluo-4-AM) aus, der über FLIPR quantifiziert werden kann.

In Abbildung 19 ist das Prinzip einer FLIPR-Messung dargestellt. Nach Ligandengabe wird der Rezeptor aktiviert, der über die G-Protein-Chimäre $G_{\alpha 16\text{gust}44}$ Phospholipase $C\beta_2$ ($PLC\beta_2$) aktiviert. Aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) wird dabei Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3), das Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freisetzt. Diese Ca^{2+} -Freisetzung kann wie bereits beschrieben durch den Farbstoff detektiert werden.

Für die Calcium-Imaging Experimente wurde eine HEK293 Zell-Linie verwendet, die die G-Protein-Chimäre $G_{\alpha 16\text{gust}44}$ stabil exprimiert. Diese Zellen wurden transient mit den verschiedenen Rezeptormutanten transfiziert, die in dieser Arbeit kloniert worden sind. Bei den Expressionsplasmiden rTas1r2 Δ C und rTas1r3 Δ C sind Plasmide eingesetzt worden, die kein C-terminales Antikörper-Epitop mehr besitzen, um die Signaltransduktion nicht zu beeinflussen. Nach 30 Stunden wurden die Zellen für den Versuch eingesetzt, wobei zwei parallele Messungen durchgeführt wurden. Die Aktivierung des Rezeptors wurde nach Komplexbildung des Ca^{2+} mit dem Farbstoff Fluo-4-AM mit Hilfe der FLIPR-Software quantifiziert. Um die Variationen der Zellzahl sowie die Responsivität der Zellen bei der Auswertung auszugleichen, wurde der endogene Somatostatin-Rezeptor der Zellen durch SST-14 als zweitem Liganden aktiviert und dieses Signal bei der Auswertung berücksichtigt. Das Signal, das nach Ligandengabe zu den beiden Wildtyprezeptoren gemessen wurde ist auf 100 % und zu den weiteren Messungen der verschiedenen Rezeptormutanten in ein prozentuales Verhältnis gesetzt worden. Als Ligand wurde bei allen FLIPR-Experimenten Steviosid, ein natürlicher Süßstoff, in einer Konzentration von 3 mM eingesetzt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse der FLIPR-Messungen nach Transfektion der verschiedenen rTas1r2-Mutanten mit dem rTas1r3_{WT}-Rezeptor dargestellt. Zu erkennen ist, dass in den meisten Fällen das Ca^{2+} -Signal um ca. 50% reduziert worden ist. Es gibt nur zwei Mutanten des rTas1r2 (N 87 [Abbildung 20 2] und N 491 [Abbildung 20 9]), bei denen das Signal auf 80% reduziert wurde. Die Rezeptormutante rTas1r2_{N484Q} [Abbildung 20 8] zeigt ein genauso gutes Ca^{2+} -Signal wie die Kombination aus rTas1r2_{WT} und rTas1r3_{WT}. Hier ist der Einfluss der N-Glykosylierung auf die korrekte Rezeptorfaltung nur wenig ausgeprägt. Ein schwächeres Signal zeigt

die Mutante, deren C-Terminus deletiert wurde [Abbildung 20 11]. Hier liegt das Signal bei 40%. Das G-Protein scheint nicht mehr so effektiv binden zu können.

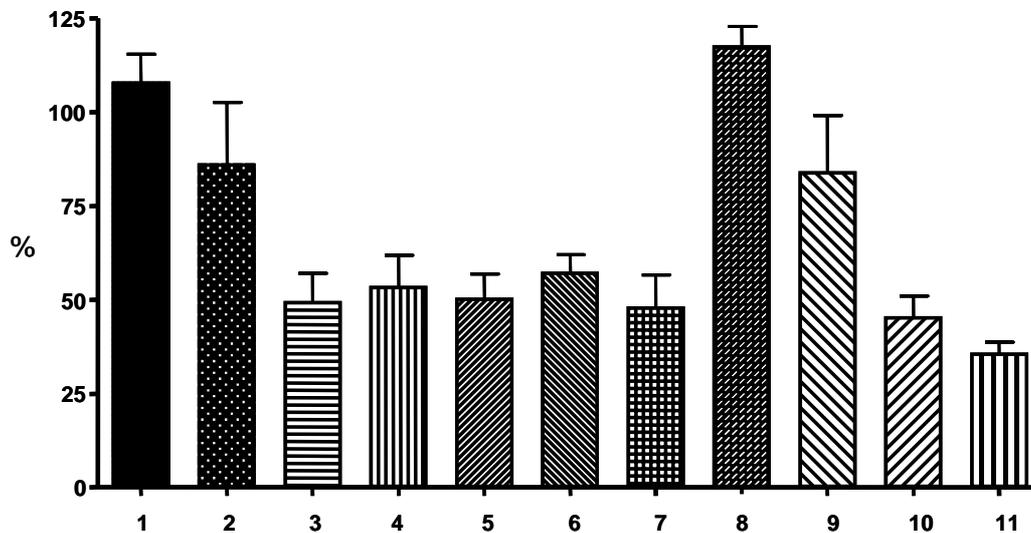


Abbildung 20: Ergebnis der FLIPR-Messungen nach Transfektion von rTas1r2_{WT} und rTas1r2-Mutanten mit dem rTas1r3_{WT}-Rezeptor.

Es wurden HEK293, die $G_{\alpha 16\text{gust}44}$ stabil exprimieren, transient mit den unterschiedlichen rTas1r2_{WT} bzw. seinen Mutanten und mit dem rTas1r3_{WT} ko-transfiziert und nach Ligandengabe (Steviosid: 3 mM) im FLIPR gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mittels der FLIPR-Software und PRISM ausgewertet. 1: rTas1r2_{WT}/rTas1r3_{WT}, 2: rTas1r2₈₇/rTas1r3_{WT}, 3: rTas1r2₂₉₆/rTas1r3_{WT}, 4: rTas1r2₃₁₆/rTas1r3_{WT}, 5: rTas1r2₃₅₅/rTas1r3_{WT}, 6: rTas1r2₃₇₂/rTas1r3_{WT}, 7: rTas1r2₄₃₂/rTas1r3_{WT}, 8: rTas1r2₄₈₄/rTas1r3_{WT}, 9: rTas1r2₄₉₁/rTas1r3_{WT}, 10: rTas1r2₅₃₁/rTas1r3_{WT}, 11: rTas1r2 Δ C/rTas1r3_{WT}.

In Abbildung 21 ist die Auswertung des FLIPR-Experimentes nach Transfektion von rTas1r2_{WT} mit rTas1r3-Rezeptormutanten abgebildet. Hier ist zu sehen, dass das Ca^{2+} -Signal im Allgemeinen auf unter 50% reduziert worden ist. Die Rezeptor-Mutanten rTas1r3 Δ C (Abbildung 21 12) und rTas1r3_{N130Q} (Abbildung 21 4) zeigen ein Signal von ca. 10% bzw. 5% bezogen auf das rTas1r2_{WT}/rTas1r3_{WT}-Signal. Für die rTas1r3 Δ C-Mutante scheint die Deletion des C-Terminus einen großen Einfluss auf die Signaltransduktion zu nehmen. Möglicherweise ist die Bindung des G-Proteins nicht mehr richtig möglich und verhindert so die Signaltransduktion. Bei der Rezeptormutante rTas1r3_{N130Q} konnte auch in der Ko-IP keine Interaktion mehr nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12). Die Mutante rTas1r3_{N203Q} zeigt ein genauso hohes Ca^{2+} -Signal

wie die beiden Wildtyp-Rezeptoren. Hier scheint der Einfluss der N-Glykosylierung auf die Rezeptorfaltung nicht so groß zu sein.

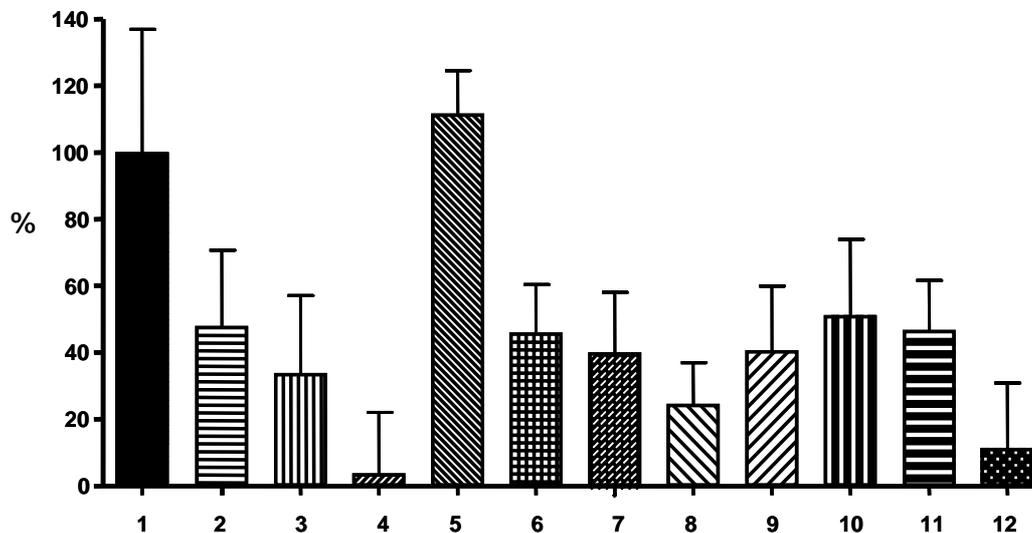


Abbildung 21: Ergebnis der FLIPR-Messungen nach Transfektion von rTas1r2_{WT} mit rTas1r3_{WT} und rTas1r3-Mutanten.

Es wurden HEK293, die $G_{\alpha 16\text{gust}44}$ stabil exprimieren, transient mit den unterschiedlichen rTas1r2_{WT} und mit dem rTas1r3_{WT} bzw. seinen Mutanten ko-transfiziert und nach Ligandengabe (Steviosid: 3 mM) im FLIPR gemessen. Die erhaltenen Daten wurden mittels der FLIPR-Software und PRISM ausgewertet. 1: rTas1r2_{WT}/rTas1r3_{WT}, 2: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₊₅₈, 3: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₈₅, 4: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₁₃₀, 5: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₂₀₃, 6: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₂₆₄, 7: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₃₇₉, 8: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₃₈₇, 9: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₄₁₈, 10: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₄₃₉, 11: rTas1r2_{WT}/rTas1r3₄₈₂, 12: rTas1r2_{WT}/rTas1r3 Δ C.

Abschließend konnte mit diesem experimentellen Ansatz gezeigt werden, dass in der Regel die Mutation einer N-Glykosylierungsstelle zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Signals führt. Ob dies aus einer direkten Wechselwirkung zwischen N-Glykosylierung und Ligandenbindung resultiert, kann daraus nicht geschlossen werden. Es kann sich auch um einen indirekten Mechanismus handeln, bei dem durch die Mutation der N-Glykosylierung die Faltung bzw. Dimerisierung der Rezeptoren behindert wird und dies somit zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Signals führt. Auch bei den C-terminal verkürzten Rezeptoren ist eine Reduktion des Ca^{2+} -Signals zu erkennen, hier wird wahrscheinlich die Kopplung des G-Proteins beeinflusst.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung eines potentiellen Interaktionspartners der C-terminalen Domäne des rTas1r1 und rTas1r2

3.2.1 Auswertung des Hefe Zwei-Hybrid Screens

Um Proteine zu identifizieren, die spezifisch mit der intrazellulären C-terminalen Domäne des rTas1r1 interagieren, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Schmale in der Diplomarbeit von Gabriel Frank ein Hefe Zwei-Hybrid Screen durchgeführt. Hierfür wurde eine humane Keratinozyten-cDNA-Bibliothek in pACT verwendet, da eine geschmacksspezifische cDNA Bibliothek zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand. Es konnte aber erwartet werden, dass die humane Keratinozyten-cDNA-Bibliothek eine ähnliche Proteinzusammensetzung besitzt wie das Geschmacksgewebe, da Geschmackssinneszellen aus Keratinozyten durch noch unbekannte Faktoren differenzieren.

In diesem Hefe Zwei-Hybrid Screen wurden insgesamt 1.9×10^6 Klone gescreent. Nach der Durchführung von mehreren Selektionsverfahren verblieben 19 positive Klone, bei denen es sich 9-mal um das humane Four and a half LIM Protein (hFHL-2) handelte. Diese Klone unterscheiden sich nur in dem Vorhandensein bzw. in der Länge der 5'-untranslatierten Region.

Um die gefundene Interaktion mit der C-terminalen Domäne des rTas1r1 näher zu charakterisieren, wurde für Fhl-2 die cDNA Sequenz der Ratte eingesetzt, die über die Datenbank des NCBI-Servers veröffentlicht war. Die Klonierung der cDNA Sequenz des rFhl-2 erfolgte mit genspezifischen Oligonukleotiden aus der cDNA einer circumvallaten Papille einer adulten Ratte.

3.2.2 Überprüfung der Spezifität der Bindung und Identifizierung der die Bindung vermittelnden Domäne des rFhl-2

In dieser Arbeit wurde nun der Frage nachgegangen, ob auch das Ratten-Ortholog von Fhl-2 die Interaktion mit der C-terminalen Domäne des rTas1r1 zeigt und ob diese Interaktion auch mit den C-terminalen Domänen des rTas1r2 und rTas1r3 nachzuweisen ist. Um die Spezifität der gefundenen Interaktion zu überprüfen, wurde das GAL4 Hefe-Zwei-Hybrid-System der Firma BD Clontech

eingesetzt. Hier wird die GAL4 DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) bzw. Aktivator-domäne (GAL4-AD) durch verschiedene Vektoren kodiert. Durch Transformation in den Hefestamm AH109 und eine räumliche Wechselwirkung der Aktivator-domäne mit der Bindungsdomäne - vermittelt durch die zu testende Proteininteraktion - können positive Interaktionen selektiert werden. Über den GAL4 Promotor werden die Reportergene lacZ, HIS3 und ADE2 induziert. Die beiden weiteren Selektionsmarker LEU2 und TRP1 werden durch die beiden eingesetzten Plasmide pGBKT7 und pGADT7 übertragen. Im Falle einer Interaktion können die Hefetransformanten auf Selektionsplatten (-A/-H/-L/-T) wachsen.

Die C-terminalen Domänen der Rezeptoren rTas1r1 (nt 2426-2523), rTas1r2 (nt 2441-2532) und rTas1r3 (nt 2454-2577) wurden jeweils in die beiden Plasmide pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Außer der vollständigen cDNA-Sequenz des Rattenorthologs Fhl-2 (nt 1-840) wurden verschiedene Deletionsmutanten von rFhl-2 kloniert. Mit diesen Deletionsmutanten sollte der Bereich des Proteins eingegrenzt werden, der die Bindung zwischen rFhl-2 und rTas1r1-ct bzw. rTas1r2-ct vermittelt. Zur Klonierung der verschiedenen Deletionsmutanten von rFhl-2 wurde zunächst die Volllänge cDNA (nt 1-840) mit spezifischen Primern aus einer cDNA-Matrize der circumvallaten Papille der Ratte amplifiziert und in die beiden Plasmide pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Um die verschiedenen Deletionsmutanten von rFhl-2 zu klonieren, wurden diese mithilfe spezifischer Primer aus einer cDNA-Matrize der circumvallaten Papille der Ratte amplifiziert und in die beiden Vektoren pGADT7 und pGBKT7 kloniert. Hierfür wurde zunächst eine Datenbank-Analyse zur Domänenstruktur des FHL-2 Proteins auf Aminosäure-Sequenzebene durchgeführt. In Abbildung 22 ist die Domänenstruktur des rFhl-2 dargestellt. Das rFhl-2 besteht aus vier vollständigen und einer halben N-terminalen LIM-Domäne. Die LIM-Domäne ist eine Cystein-Histidin-reiche Doppelzinkfingerstruktur und bildet Protein-Protein-Interaktionen aus.



Abbildung 22: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von rFhl-2.

Die blaue Box symbolisiert die halbe LIM-Domäne und die roten Boxen die vollständigen LIM-Domänen. LIM ist eine Cystein-Histidin-reiche Doppelzinkfingerstruktur und wird zur Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen verwendet.

Es sind die nachfolgend aufgezählten Deletionsmutanten entstanden: rLim $\frac{1}{2}$ -1 (nt 1-279), rLim $\frac{1}{2}$ -3 (nt 1-636), rLim 2-3 (nt 301-636) und rLim 3-4 (nt 484-840), die jeweils eine unterschiedliche Anzahl an LIM-Domänen besitzen. Anschließend wurden Hefe-Transformationsexperimente mit rFhl-2 und den verschiedenen rFhl-2 Mutanten mit den drei C-terminalen Domänen der Rezeptoren durchgeführt und die Interaktion über das Wachstum auf den Selektionsplatten (-A/-H/-L/-T) bestimmt. Diese Experimente sind jeweils mit rFhl-2 und seinen Deletionskonstrukten, die fusioniert an die DNA-Bindedomäne waren, und mit den C-terminalen Domänen der rTas1r-Familie, die an die Aktivator-domäne gebunden waren, und in umgekehrter Anordnung durchgeführt worden (DN-Bindedomäne fusioniert an die C-terminalen Domänen von rTas1r und Aktivator-domäne an rFhl-2 und seinen Deletionsmutanten).

In Tabelle 3-2 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Es konnte deutlich gezeigt werden, dass das Rattenortholog rFhl-2 wie das gefundene hFHL-2 ebenfalls mit der C-terminalen Domäne von rTas1r1 interagiert. Weiter ergaben die Experimente mit den Deletionsmutanten rLim $\frac{1}{2}$ -1, rLim $\frac{1}{2}$ -3, rLim 2-3 und rLim 3-4, dass die Bindung über die halbe LIM-, erste LIM-, zweite LIM- und dritte LIM-Domäne ausreichend ist und die vierte LIM-Domäne nicht an der Interaktion beteiligt ist. Es zeigte sich zusätzlich, dass die Interaktion stärker ist je mehr LIM-Domänen an der Bindung beteiligt sind. Die C-terminale Domäne von rTas1r2 weist eine schwächere Interaktion mit dem rFhl-2 und den verschiedenen Deletionsmutanten auf, während die C-terminale Domäne von rTas1r3 keine Interaktion mit rFhl-2 zeigt. Als Negativ-Kontrolle wurde in allen Hefeexperimenten mFhl-1 eingesetzt, das eine gleiche Domänenstruktur wie das rFhl-2 besitzt. Dieses Protein interagiert jedoch nicht mit den C-terminalen Domänen der Rezeptoren der rTas1r-Familie. mFhl-1 gehört auch zu der FHL-

Proteinfamilie und soll zeigen, dass nicht die LIM-Domäne als solche die Interaktion vermittelt, sondern es sich um eine spezifische Interaktion mit dem rFhl-2 handelt.

Tabelle 3-2: Schematische Darstellung der verschiedenen rFhl-2 Konstrukte zur Überprüfung der Interaktion mit den Mitgliedern der rTas1r-Familie im Hefe-System.

Eingesetzt wurden die C-terminalen Domänen der rTas1r-Familie und das vollständige rFhl-2 und verschiedene Deletionsmutanten. – (keine) oder +++ (starke Interaktion) geben die Fähigkeit zum Wachstum auf den Selektionsplatten (-A/-H/-L/-T) an. mFhl-1 wurde zusätzlich zur Interaktion mit den C-Termini der rTas1r-Familie eingesetzt, um die Spezifität der Bindung zu überprüfen.

	Interaktion mit dem C-Terminus von		
	rTas1r1	rTas1r2	rTas1r3
rFhl-2 840 bp N- [blue box] [red box] [red box] [red box] [red box] -C	+++	++	-
rLim 1/2-1 635 bp N- [blue box] [red box] -C	++	+	-
rLim 2-3 635 bp N- [red box] [red box] -C	++	+	-
rLim 1/2-3 635 bp N- [blue box] [red box] [red box] [red box] -C	+++	++	-
rLim 3-4 340 bp N- [red box] [red box] -C	-	-	-
mFhl-1 844 bp N- [blue box] [red box] [red box] [red box] [red box] -C	-	-	-

Für die Bestimmung der relativen β -Galaktosidase-Aktivität, einem weiterem Maß für die Stärke der gefundenen Interaktion, wurden Hefezellen des Stammes AH109 mit rFhl-2 bzw. Deletionsmutanten rLim 1/2-3 und rLim 3-4 mit den jeweiligen C-terminalen Domänen von rTas1r transformiert. Die enzymatische β -Galaktosidase-Aktivität wurde anschließend photometrisch vermessen und daraus die relativen β -Galaktosidase-Einheiten bestimmt.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der β -Galaktosidase-Einheiten dieser Transformationsexperimente als Balkendiagramm dargestellt. Hier wurde deutlich, dass die höchsten relativen β -Galaktosidase-Einheiten für das Volllänge Protein rFhl-2 mit der C-terminalen Domäne von rTas1r1 mit 10.1 erreicht wurde. Schon deutlich niedrigere relative β -Galaktosidase-Einheiten wurden für rLim 1/2-3 mit rTas1r1 (mit 3.5) gemessen. Keine signifikante Aktivität ergab

sich bei rLim 3-4 und mFhl-1 (als Negativ-Kontrolle) mit allen drei C-terminalen Domänen.

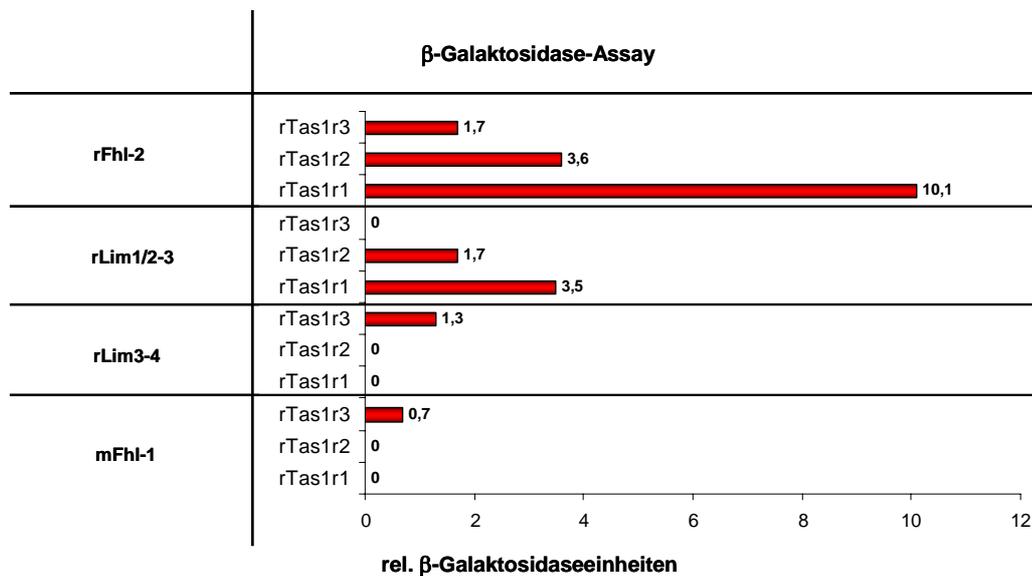


Abbildung 23: Bestimmung der relativen β-Galaktosidase-Aktivität von rFhl-2, rLim ½ -3, rLim 3-4 und mFhl-1 mit den Mitgliedern der rTas1r-Familie.

Eingesetzt wurden rFhl-2, rLim ½-3, rLim 3-4 und mFhl-1, um die enzymatische β-Galaktosidase-Aktivität zu bestimmen. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt.

3.2.3 Expressionsanalyse des rFhl-2 in sensorischen Geweben und anderen Organen der Ratte mittels RT-PCR

Die Voraussetzung für eine Interaktion zwischen rFhl-2 und rTas1r1 oder rTas1r2 *in vivo* ist eine Expression von rFhl-2 im Geschmacksgewebe der Ratte. Das Expressionsmuster von rFhl-2 wurde mit Hilfe von RT-PCR analysiert (Abbildung 24). Es wurde RNA aus enzymatisch präparierten fungiformen, foliaten und circumvallaten Geschmackspapillen von Rattenzungen, des Geschmackstreifens und des olfaktorischen Epithels als sensorische Gewebe und Zungenepithel, Skelettmuskel, Gehirn, Herz und Niere als nicht-sensorische Gewebe verwendet. Da für die weiteren Untersuchungen im heterologen Expressionssystem HEK293 Zellen verwendet werden sollten, wurde auch RNA aus der entsprechenden Zell-Linie eingesetzt.

Um das 430 bp lange Teilfragment der Fhl-2-cDNA-Sequenz (nt 326-756) zu amplifizieren, wurden degenerierte Oligonukleotide (rhFHL-2,f und rhFHL-2,r), die sowohl zur humanen als auch zur Rattensequenz komplementär waren, eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA wurden degenerierte Oligonukleotide

rhHGPRT,f und rhHGPRT2r zur Amplifizierung der konstitutiv exprimierten Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyltransferase (nt 20-545) verwendet.

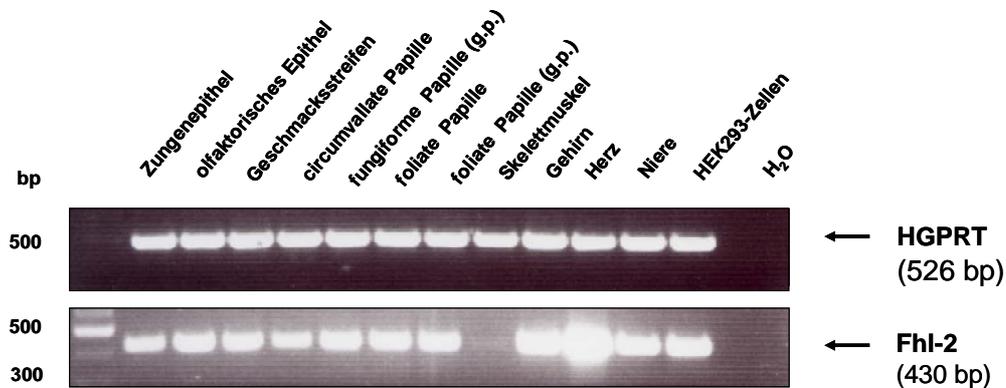


Abbildung 24: Expression von rFhl-2 in sensorischen und nicht-sensorischen Geweben.

Hierfür wurden cDNAs aus sensorischen Geweben (Zungenepithel, olfaktorisches Epithel, Geschmackstreifen, circumvallate Papille, fungiforme Papille, foliate Papille), nicht-sensorisches Gewebe (Skelettmuskel, Gehirn, Herz und Niere) und aus HEK293 Zellen eingesetzt. Es wurde zur Kontrolle ein Teilfragment der konstitutiv exprimierten Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyltransferase (HGPRT) amplifiziert. g.p: grob präpariert

Es konnte das 430 bp große Fragment der rFhl-2 cDNA in allen verwendeten RNAs der verschiedenen sensorischen und nicht-sensorischen Geweben, sowie in den HEK293 Zellen nachgewiesen werden. Die Kontroll-PCR mit HGPRT zeigt, dass von allen eingesetzten cDNAs gleiche Mengen amplifiziert worden sind. Nur die Expression von rFhl-2 im Skelettmuskel ist schwächer. Diese schwache Expression in der RT-PCR von FHL-2 im Skelettmuskel ist auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt worden, während in Northern Blot-Untersuchungen die Expression besser detektierbar ist (Genini et al., 1997; Scholl et al., 2000, Tanahashi & Tabira, 2000).

3.2.4 Ko-Immünpräzipitation der C-terminalen Domänen von rTas1r1, rTas1r2, rTas1r3 mit rFhl-2 aus HEK293 Zellen

Da bekannt ist, dass es im Hefe-Zwei-Hybrid System zu unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Reporter genen kommen kann, mussten weitere Experimente in einem heterologen Expressionssystem durchgeführt werden. In diesem Fall sollte die Interaktion biochemisch mit Ko-Immünpräzipitationen bestätigt werden.

Dazu wurden die C-terminalen Domänen der Rezeptoren rTas1r1 (nt 2428-2523), rTas1r2 (nt 2443-2532) und rTas1r3 (nt 2454-2577) jeweils in das Plasmid pEGFP kloniert, um ein Fusionsprotein aus der jeweiligen C-terminalen Domäne der Rezeptoren rTas1r und dem grünfluoreszierenden Protein zu erhalten. Die gesamte kodierende Region von rFhl-2 wurde aus der cDNA der circumvallaten Papille der Ratte amplifiziert und in den Expressionsvektor pcDNA3.1 mycHis A (rFhl-2 pcDNA3.1 mycHis A) kloniert. Der resultierende Vektor kodiert ein mit einem C-terminalen myc-Epitop markiertes rFhl-2 (rFhl-2-myc). HEK293-Zellen wurden mit EGFP-rTas1r1-ct, EGFP-rTas1r2-ct bzw. EGFP-rTas1r3-ct und jeweils rFhl-2-myc ko-transfiziert (Abbildung 25 A) und 30 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach der Zell-Lyse in Co-IP-Puffer (enthält EDTA) folgte eine Ko-Immunpräzipitation mit Anti-myc Antikörper über Protein G Agarose. Die Analyse der Ko-Immunpräzipitation erfolgte mittels Western Blot.

Hierfür wurden äquivalente Mengen des Ausgangsmaterials (Lysate, I), der Überstände (Ü) und der Präzipitate (IP) auf zwei Gele aufgetragen, wobei ein Blot zur Detektion der EGFP-fusionierten C-terminalen Domänen der Rezeptoren mit einem Anti-GFP-Antikörper und der zweite zur Detektion von rFhl-2-myc mit einem Anti-myc-Antikörper inkubiert wurde. Abbildung 25 B-D zeigt die Ergebnisse. Es konnte in keinem Fall eine Interaktion zwischen rFhl-2-myc und den C-terminalen Domänen der Rezeptoren nachgewiesen werden.

In der Literatur ist beschrieben, dass eine Interaktion von FHL-2 nur nachweisbar ist, wenn in den Zell-Lyse-Puffern Zn^{2+} -Ionen vorhanden sind, welche für die korrekte Faltung des rFhl-2 notwendig sind (ELMourabit et al., 2004, Tanahashi & Tabira, 2000). Experimente mit $50 \mu M$ Zn^{2+} -Ionen zeigten keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen den C-terminalen Domänen der Rezeptoren und rFhl-2-myc (Daten nicht gezeigt).

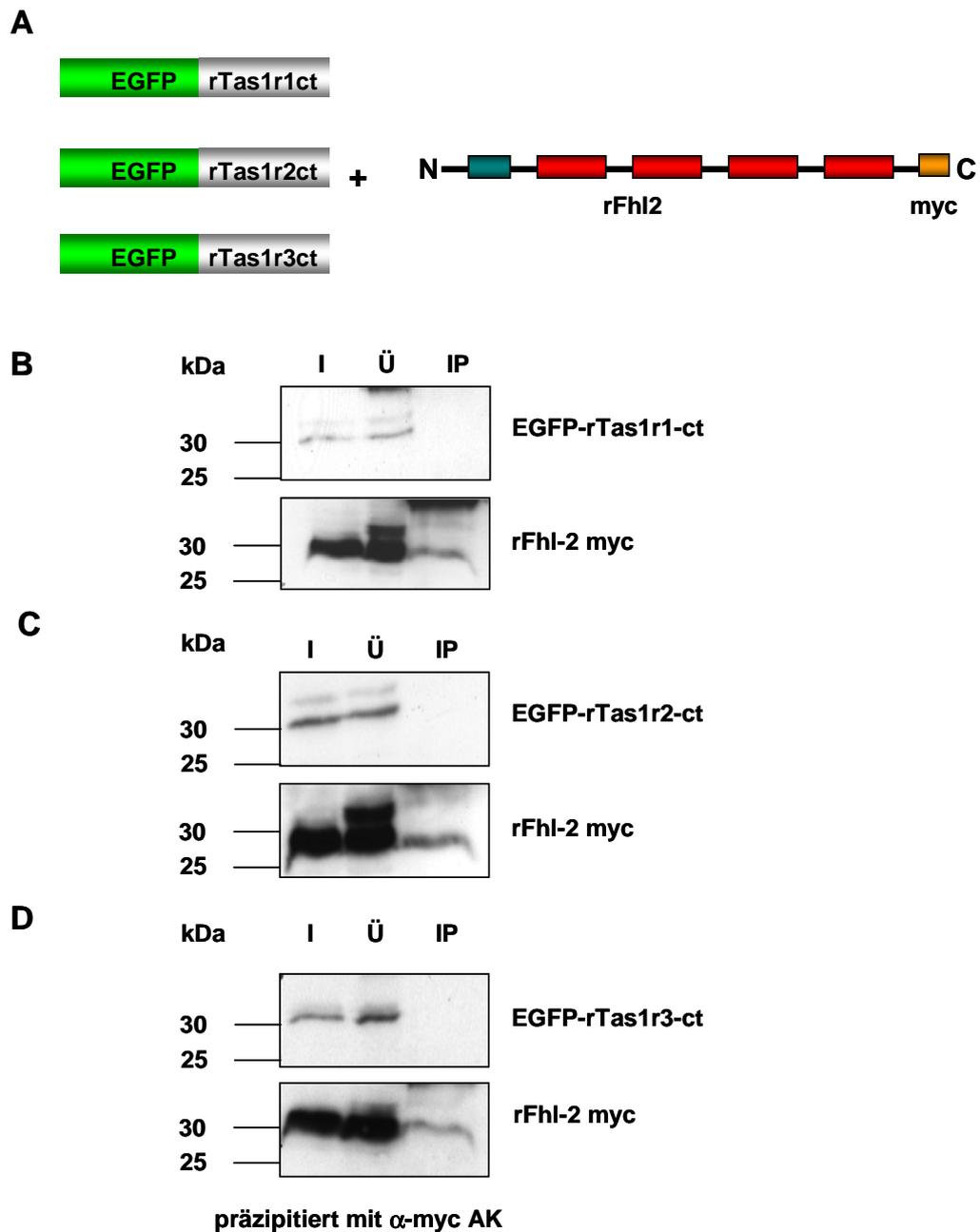


Abbildung 25: Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) von rFhl-2-myc mit EGFP-rTas1R1-ct, EGFP-rTas1r2-ct und EGFP-rTas1r3-ct aus HEK293 Zellextrakt.

A. Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte. B-D. Die aufgeführten Proteine wurden in HEK293 Zellen exprimiert und mit Anti-myc-Antikörper präzipitiert. Lysate (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (IP) wurden mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen das myc-Epitop (Anti-myc) und gegen EGFP (Anti-GFP). Es konnte keine Interaktion nachgewiesen zwischen rTas1r-ct und rFhl-2 werden.

In einem weiteren Experiment wurde ein N-Terminal fusioniertes T7-rFhl-2-Expressionskonstrukt verwendet, um auszuschließen, dass die Interaktion durch

das verwendete C-terminale myc-Antikörper-Epitop behindert wird. Auch hier konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

3.2.5 Ko-Immünpräzipitation von rFhl-2 mit dem Süßgeschmacksrezeptor

Da die Hefe-Interaktionsexperimente eine Interaktion zwischen den C-terminalen Domänen von rTas1r1 und rTas1r2 mit rFhl-2 gezeigt haben, diese Interaktion jedoch nicht in den Ko-Immünpräzipitation der isolierten C-terminalen Domänen der rTas1r-Familie in eukaryonter Zellkultur bestätigt werden konnte, sollte die Bindung zwischen rFhl-2 und dem vollständigen Süßgeschmacksrezeptor rTas1r2 und rTas1r3 überprüft werden.

Zum biochemischen Nachweis einer Interaktion des rekombinant exprimierten rFhl-2 mit dem Süßgeschmacksrezeptor, wurden wiederum Ko-Immünpräzipitationen (Ko-IPs) durchgeführt. Hierfür wurde das rFhl-2 N-terminal mit EGFP fusioniert. Dieses Fusionsprotein erlaubt die Kontrolle der Expression über die Autofluoreszenz des GFPs. Außer der vollständigen cDNA von rFhl-2 (nt 1-840) wurden die weiteren Deletionskonstrukte rLim $\frac{1}{2}$ -1 (nt 1-279), rLim $\frac{1}{2}$ -3 (nt 1-636) und rLim 3-4 (nt 484-840) in den Expressionsvektor pEGFP C3 kloniert.

In Abbildung 26 A sind die entstandenen Expressionskonstrukte schematisch dargestellt. Nach transienter Transfektion in eine HEK293 Zelllinie, die stabil den rTas1r2 und rTas1r3 exprimiert, wurden Ko-IPs wie unter Kapitel 2.2.3.3 beschrieben, durchgeführt. Zur Präzipitation wurde ein Anti-FLAG-Antikörper verwendet, der kovalent an Agarose gekoppelt ist. Für die Auswertung der Ko-IP wurden gleiche Mengen des Zell-Lysates (I), des Überstandes (Ü) und des Präzipitates (IP) auf mehrere Gele geladen. Die Detektion von rTas1r2-FLAG bzw. rTas1r3-HSV erfolgte mit einem Anti-FLAG-Antikörper bzw. einem Anti-HSV-Antikörper. Die rekombinant exprimierten Proteine EGFP-rFhl-2, EGFP- rLim $\frac{1}{2}$ -1, EGFP- rLim $\frac{1}{2}$ -3 und EGFP-rLim 3-4 wurden mit einem Anti-GFP-Antikörper nachgewiesen.

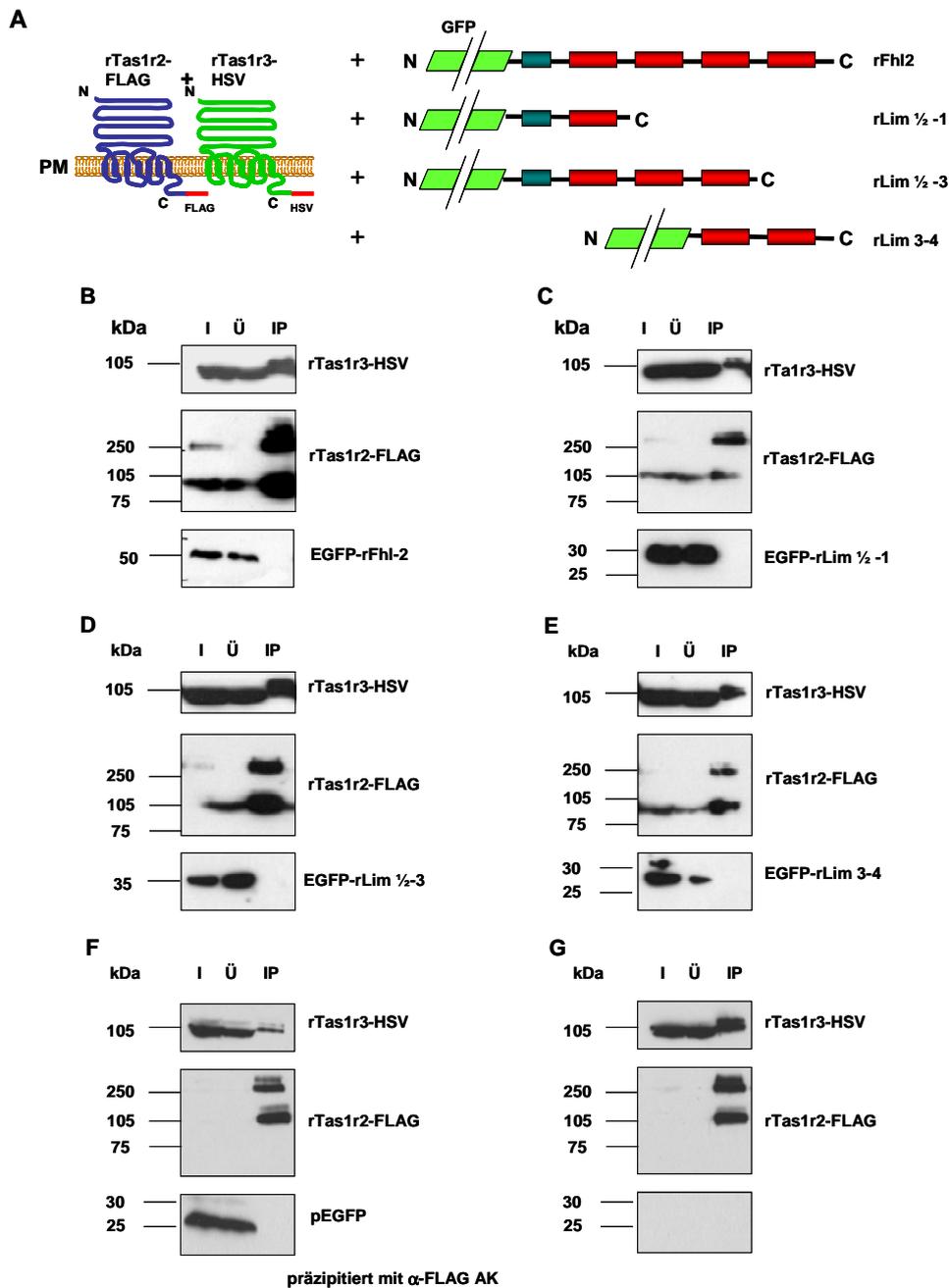


Abbildung 26: Ko-Immünpräzipitation von rTas1r2-Flag, rTas1r3-HSV und EGFP-rFhl-2 bzw. verschiedenen Deletionskonstrukten von rFhl-2 aus HEK293-Zellextrakt.

A: Schematische Darstellung der verwendeten rTas1r2, rTas1r3 und rFhl-2 Konstrukte. B-E: EGFP-rFhl-2 und die verschiedenen Deletionskonstrukte wurden in eine Zell-Linie transfiziert, die stabil den Süßgeschmacksrezeptor exprimiert und mit Anti-FLAG Antikörper präzipitiert. Lysate (I), Überstände (Ü) und Präzipitate (IP) wurden mittels Western Blot analysiert. Die Detektion der Fusionsproteine erfolgte durch die Verwendung spezifischer Antikörper gegen das FLAG-Epitop (Anti-FLAG), das HSV-Epitop (Anti-HSV) und gegen EGFP (Anti-GFP). Es konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. F: Hier wurde die stabile Zell-Linie mit pEGFP transfiziert, die Ko-IP wie zuvor beschrieben durchgeführt und die Fusionsproteine analysiert. Der verwendete Expressionsvektor zeigt keine unspezifische Interaktion mit dem Süßgeschmacksrezeptor. G: Hier wurde die untransfizierte, den Süßgeschmacksrezeptor exprimierende stabile Zell-Linie zur Ko-IP eingesetzt und die Proteine anschließend im Western Blot analysiert. Der verwendete Anti-GFP-Antikörper zeigt keine unspezifischen Banden im Western Blot.

In Abbildung 26 B-E sind die Ergebnisse der Ko-Immunpräzipitation dargestellt. In 26 B ist die Ko-IP von EGFP-rFhl-2 mit den Rezeptoren rTas1r2-FLAG und rTas1r3-HSV gezeigt. Der Nachweis der beiden Rezeptoren ist erfolgreich durchgeführt worden. EGFP-rFhl-2 ist jedoch nicht im Präzipitat nachweisbar, nur im Zell-Lysat und Überstand. Dies gilt auch für die anderen eingesetzten Deletionskonstrukte des rFhl-2. Zur Kontrolle wurden Zellen mit einem leeren Expressionsvektor (pEGFP C3) und untransfizierte, den Süßgeschmacksrezeptor stabil exprimierende Zellen zur Ko-IP eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 26 F und G dargestellt. Die Expression von pEGFP C3 zeigt keine Interaktion mit dem rTas1r2 und dem rTas1r3 im Präzipitat (IP).

In der untransfizierten, den Süßgeschmacksrezeptor stabil exprimierenden Zell-Linie zeigte der Anti-GFP-Antikörper keine unspezifischen Banden im Western Blot.

3.2.6 Ko-Expression von rTas1r2 und rTas1r3 mit rFhl-2 in HEK293

Zellen

In den Kapiteln 3.2.4 und 3.2.5 wurde dargestellt, dass biochemisch in Zellkultur-Zellen weder eine Interaktion von rFhl-2 mit den C-terminalen Domänen der Rezeptoren noch mit dem ganzen Rezeptor nachweisbar ist. Dies kann verschiedene Ursachen haben, z.B. als Artefakt des Hefe-Zwei-Hybrid Systems eine falsch-positive Interaktion untersucht worden. Es sind aber auch experimentelle Gründe für den negativen Nachweis der Interaktion möglich.

Um weitere Hinweise zu erhalten, ob die Rezeptoren und das rFhl-2 miteinander interagieren, wurde die Lokalisierung dieser rekombinanten Proteine untersucht. Hierfür wurden die schon zuvor klonierten EGFP-rFhl-2-Konstrukte (siehe Abbildung 26 A) transient in eine Zell-Linie transfiziert, die stabil den Süßgeschmacksrezeptor exprimiert. Die Detektion von rTas1r2-FLAG bzw. rTas1r3-HSV erfolgte mit einem Anti-FLAG-Antikörper bzw. einem Anti-HSV-Antikörper und einem Cy3-konjugierten Zweitantikörper. Die rekombinant exprimierten Proteine EGFP-rFhl-2, EGFP-rLim $\frac{1}{2}$ -1, EGFP-rLim $\frac{1}{2}$ -3 und EGFP-rLim 3-4 wurden über ihre Autofluoreszenz nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mittels eines konfokalen Fluoreszenzmikroskopes.

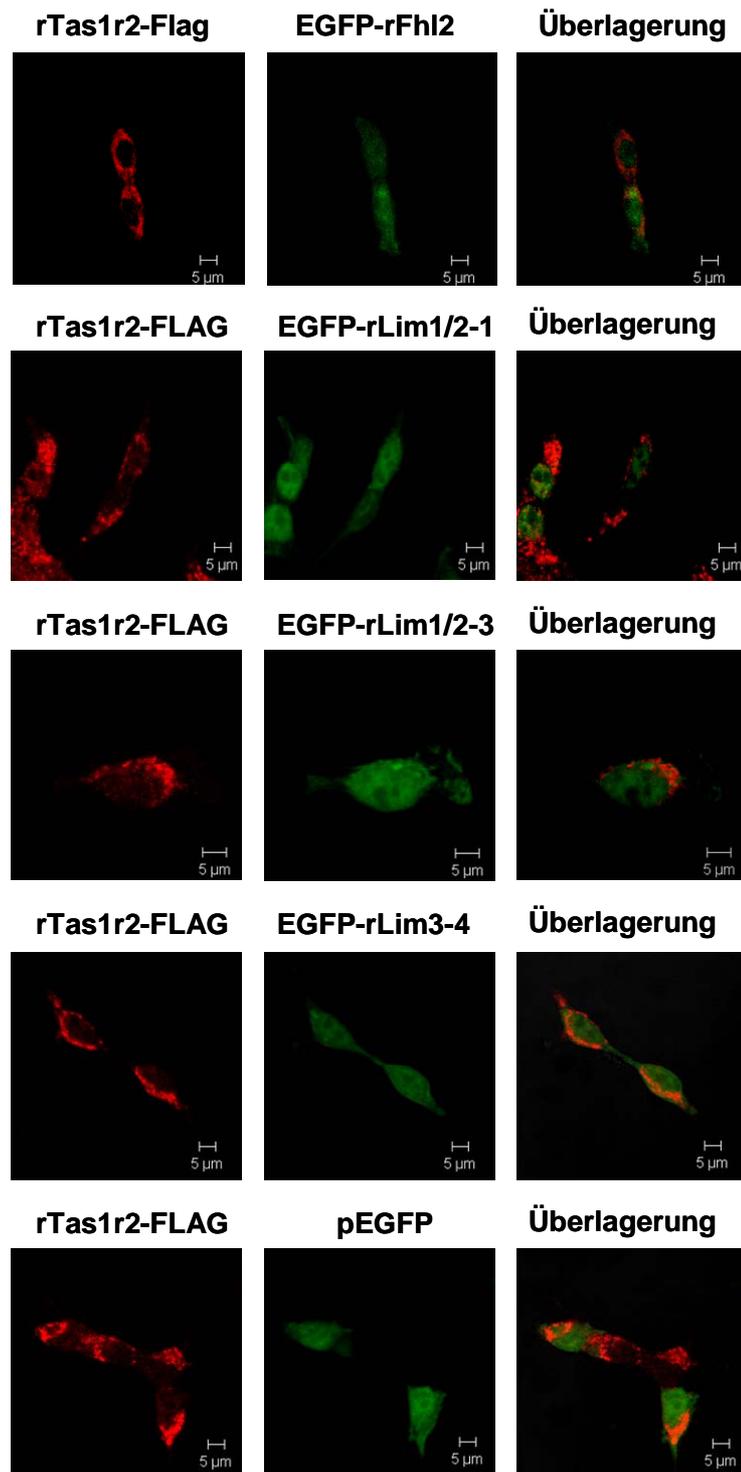


Abbildung 27: Zelluläre Lokalisierung von rTas1r2-FLAG und EGFP-rFhl-2 und seinen Deletionsmutanten in HEK293-Zellen.

Hierfür wurden HEK293-Zellen, die stabil den Süßgeschmacksrezeptor exprimieren, transient mit rFhl-2, rLim $\frac{1}{2}$ -1, rLim $\frac{1}{2}$ -3 und rLim 3-4 transfiziert, immunzytochemisch analysiert und die Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die zelluläre Verteilung des rTas1r2-FLAG (rot) zeigt sich in einer vesikulären Verteilung innerhalb des Zytoplasmas. Das EGFP-Fhl-2 und seine Deletionsmutanten EGFP-rLim $\frac{1}{2}$ -1, EGFP-rLim $\frac{1}{2}$ -3 und EGFP-rLim 3-4 (AF, grün) liegen in der Zelle im Nucleus und Zytoplasma verteilt vor.

Skalierungsbalken: 5 μ m

In Abbildung 27 ist die zelluläre Verteilung von EGFP-rFhl-2, EGFP-rLim 1/2-1, EGFP-rLim 1/2-3 und EGFP-rLim 3-4 mit rTas1r2-Flag bzw. rTas1r3-HSV zu erkennen. Die beiden Rezeptoren rTas1r2-Flag und rTas1r3-HSV zeigen ihre typische zelluläre Verteilung in vesikulären Strukturen. Die verschiedenen EGFP-rLim 1/2-1, EGFP-rLim 1/2-3 und EGFP-rLim 3-4 zeigen eine nukleäre und zytoplasmatische Verteilung und folgen nicht dem Expressionsmuster der Rezeptoren.

Diese Ergebnisse aus der Immunfluoreszenz und den Ko-Immünpräzipitationen sprechen dafür, dass rFhl-2 nicht mit rTas1r2 interagiert. Die im Hefe-System gefundene Interaktion konnte im heterologen Expressionssystem nicht bestätigt werden.

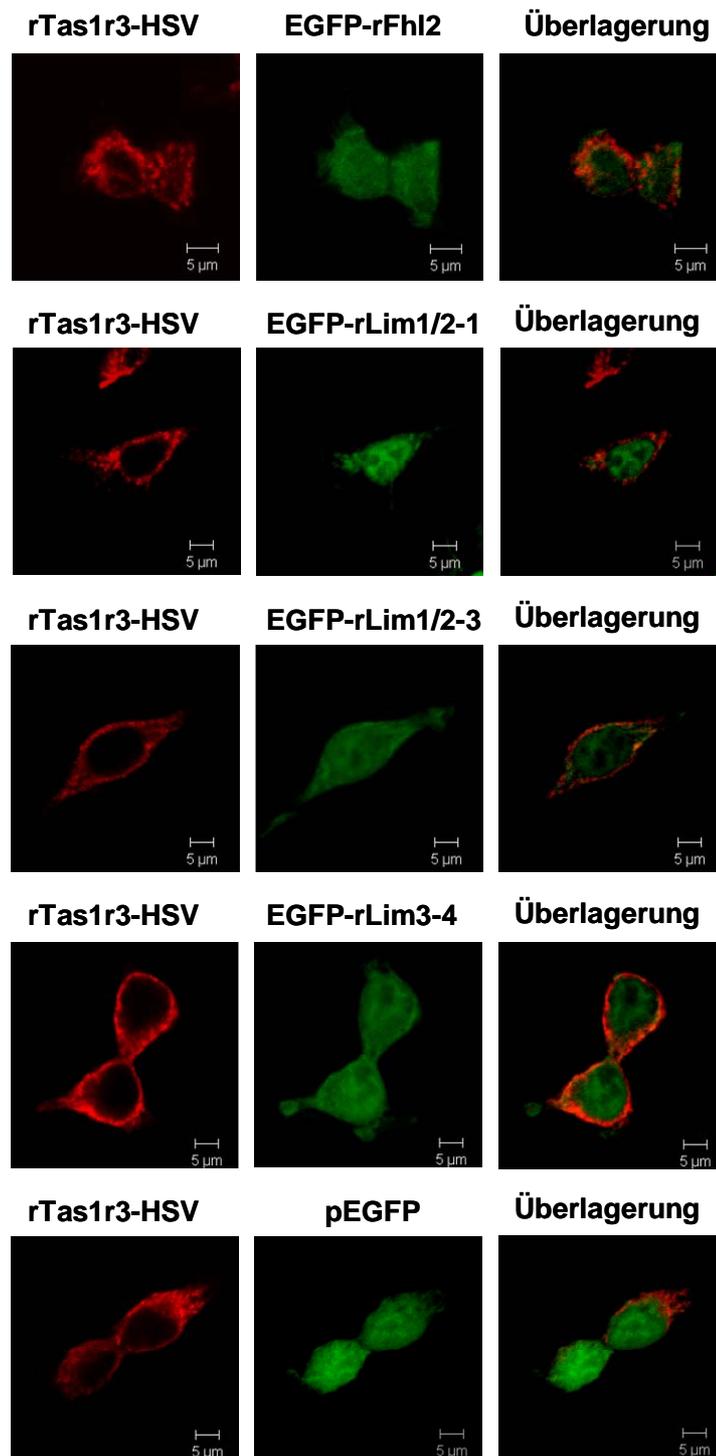


Abbildung 28: Zelluläre Lokalisierung von rTas1r3-HSV und EGFP-rFhl-2 und seinen Deletionsmutanten in HEK293-Zellen.

Hierfür wurden HEK293-Zellen, die stabil den Süßgeschmacksrezeptor exprimieren, transient mit rFhl-2, rLim 1/2-1, rLim 1/2-3 und rLim 3-4 transfiziert, immunzytochemisch analysiert und die Zellen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. Die zelluläre Verteilung des rTas1r3-HSV (rot) zeigt sich in einer vesikulären Verteilung innerhalb des Zytoplasmas. Das EGFP-Fhl-2 und seine Deletionsmutanten EGFP-rLim 1/2-1, EGFP-rLim 1/2-3 und EGFP-rLim 3-4 (AF, grün) liegen in der Zelle im Nucleus und Zytoplasma verteilt vor.

Skalierungsbalken: 5 µm

4 Diskussion

4.1 Einfluss der N-Glykosylierung auf den Süßgeschmacksrezeptor

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der N-Glykosylierung auf die Süßgeschmacksrezeptoren rTas1r2 und rTas1r3 untersucht. In der Literatur wird ein vielfältiger und variabler Einfluss der N-Glykosylierung auf die Faltung und Sekretion von Glykoproteinen beschrieben. Es gibt Glykoproteine, die nur einen partiellen Verlust ihrer Faltung oder Sekretionseffizienz erfahren, einige werden hitzeinstabil während andere davon nicht beeinträchtigt werden. Als Regel kann dabei herausgestellt werden, dass die Faltung von Glykoproteinen, die eine größere Zahl von Kohlenhydratketten besitzen, stärker von fehlender Glykosylierung beeinflusst wird. Die Analyse verschiedener Glykoproteine durch Einzelmutationen der N-Glykosylierungspositionen dokumentiert die Wichtigkeit dieser Positionen im Protein (Referenzen in Helenius & Aebi, 2004). Bei dem Süßgeschmacksrezeptor scheint die N-Glykosylierung einen Einfluss auf die Dimerisierung der beiden Rezeptoruntereinheiten rTas1r2 und rTas1r3 zu haben und darüber hinaus auch indirekt auf die Funktion.

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von Mutationsanalysen und weiteren biochemischen Untersuchungen beschrieben werden, dass die Rezeptoren rTas1r2 und rTas1r3 stark glykosyliert sind und die Glykosylierung einen Einfluss auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors hat (siehe Kapitel 4.2). Beide Rezeptoren besitzen je neun potentielle N-Glykosylierungsstellen in ihrer N-terminalen extrazellulären Domäne (siehe Tabelle 3-1). Die Behandlung des rTas1r3_{WT} mit Endoglykosidasen zeigte seine Modifizierung mit mannosereichen Zuckerketten. Diese Verknüpfung mit Oligosacchariden bestätigt einerseits die erfolgreiche Translokation des Rezeptors in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums, aber andererseits, dass keine weitergehende Modifizierung und somit kein Weitertransport entlang des sekretorischen Weges stattfindet. Dies geht einher mit seiner Anreicherung im Endoplasmatischen Retikulum, welche sich auch mit den Ergebnissen aus der Immunfluoreszenz (Abbildung 16) und

Ko-Immunpräzipitation (Abbildung 18) deckt. Hier konnte keine Plasmamembranlokalisierung des Rezeptors nachgewiesen werden, weder bei separater Transfektion noch bei Ko-Transfektion mit dem rTas1r2. In den funktionellen Experimenten konnte jedoch gezeigt werden, dass ein Teil der Rezeptoren an die Zellmembran transportiert wird und dort eine Ligandenvermittelte Aktivierung stattfindet. Die in dieser Arbeit untersuchten N-Glykosylierungsmutanten von rTas1r3 weisen bei der Endoglykosidasen-Behandlung dasselbe Verhalten wie der Wildtyprezeptor auf. Sie werden auch nur mit mannosereichen Kohlenhydratketten modifiziert wie es sich in ihrer Endo H Sensitivität zeigt (Abbildung 8). Eine Ausnahme ist die N-Glykosylierungsmutante rTas1r3_{N85Q}, die nur schwer im Zell-Lysat nachzuweisen ist. Leichter ist ihre Detektion nach zuvor durchgeführter Ko-Immunpräzipitation (siehe Kapitel 4.2).

Für den rTas1r2 (Wildtyp und N-Glykosylierungsmutanten) konnte ähnliches nicht dargestellt werden, da dieser im Western Blot nach der Endoglykosidasen-Behandlung in sehr vielen Banden detektiert wird und somit der Western Blot nicht ausgewertet werden konnte. Dies liegt am Laufverhalten dieser Rezeptoruntereinheit in der SDS-PAGE, welches auch durch experimentelle Veränderungen nicht verbessert werden konnte. Ko-IP-Experimente konnten jedoch belegen, dass rTas1r2 wie rTas1r3 prinzipiell in einer Bande bei 105 kDa detektiert werden kann (näheres unter Kapitel 4.2 und Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass rTas1r2 auch durch mannosereiche Zuckerketten modifiziert worden ist. Dies wird durch seine Anreicherung im Endoplasmatischen Retikulum in der Immunfluoreszenz (Abbildung 16) und seine Interaktion mit den ER-Marker-Proteinen Calnexin, Calreticulin und BiP/GRP78 (siehe Kapitel 4.3) zum Ausdruck gebracht. Außerdem konnte experimentell mit der extrazellulären Domäne des rTas1r2 eine Endoglykosidasen-Behandlung durchgeführt werden, die Endo H sensitive Zuckerketten an der extrazellulären Domäne aufzeigte (Daten nicht gezeigt).

Ein anderes Mitglied der Subfamilie C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, rTrx/rGprc6a, wurde in dieser Arbeit auch mit den Endoglykosidasen

Endo H und PNGase F behandelt. rTrx/rGprc6a besitzt in seiner extrazellulären Domäne neun potentielle N-Glykosylierungsstellen und eine weitere N-Glykosylierungsposition in der zweiten extrazellulären Schleife. Von hGPCR6A ist bekannt, dass er nicht an die Plasmamembran gelangt (Wellendorph & Bräuner-Osborne, 2004), während rTrx/rGprc6a und mGprc6a an die Zelloberfläche transportiert werden (N. Burhenne, 2003; Kuang et al. 2005; Wellendorph et al., 2005). rTrx/rGprc6a besitzt außer der Modifikation mit mannosereichen Zuckerketten auch weiterprozessierte komplexe Oligosaccharidketten, wie sie im Golgi-Komplex entstehen. Dies spiegelt sich in seinem differenzierten Verhalten gegenüber den Endoglykosidasen (Abbildung 10) wider, denn er besitzt neben Endo H sensitiven auch Endo H resistente Zuckerketten. Diese weitergehende Modifizierung und der Transport von rTrx/rGprc6a entlang des sekretorischen Weges wird auch durch seine funktionelle Aktivität dokumentiert (pers. Mitteilung P. Wellendorph), während der hGPCR6A nicht funktionell ist. Durch Untersuchungen an Rezeptorchimären mit der N-terminalen Domäne des hGPCR6A, der an die sieben Transmembrandomäne des Goldfischrezeptors 5.24 bzw. umgekehrt fusioniert wurde, konnten Wellendorph et al. (2005) zeigen, dass die Chimäre mit der N-terminalen Domäne von hGPCR6A besser zur Zelloberfläche transportiert wird als die Chimäre, die mit der N-terminalen Domäne des Goldfischrezeptors 5.24 fusioniert an die sieben Transmembranregion und die C-terminale Domäne des hGPCR6A. Durch funktionelle Untersuchungen dieser Chimären in *X. laevis* Oozyten konnte experimentell der Nachweis erbracht werden, dass die Signaltransduktion dieser Chimären nicht beeinträchtigt wird (Wellendorph et al., 2005).

Dies zeigt, dass schon relativ geringe spezies-spezifische Unterschiede in der Aminosäuresequenz von zwei orthologen Rezeptoren, hGPCR6A und rGprc6a, in einem heterologen Expressionssystem zu gravierenden Unterschieden im intrazellulären Transport und in der funktionellen Expression führen können. Die hier beobachteten Unterschiede im Laufverhalten der einzeln exprimierten rTas1r2 und rTas1r3 können wahrscheinlich auf ähnliche Mechanismen zurückgeführt werden.

Für verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren konnte ein Einfluss der N-Glykosylierung auf den Rezeptortransport, die Stabilität und seine Funktionalität nachgewiesen werden. Beim humanen Calcium *sensing*-Rezeptor (hCaSR) spielt die N-Glykosylierung ebenfalls bei der Faltung und Zelloberflächenexpression eine Rolle. Durch Mutationsanalysen konnten Hinweise erhalten werden, dass acht seiner elf N-Glykosylierungsstellen verwendet werden und die Mutation von mindestens drei Positionen die Oberflächenexpression verhindert. Die Glykosylierung beeinflusst jedoch die Signaltransduktion nicht (Ray et al., 1998). Für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit einem kurzen N-Terminus, z.B. Rezeptoren aus der Rhodopsinfamilie oder Peptidrezeptoren, die nur ein oder zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzen, zeigte sich bei Veränderung des Glykosylierungsstatus eine verringerte Oberflächenexpression (Kaushal et al., 1994; Ding et al., 1995).

Bei mOR-EG, einem olfaktorischen Rezeptor der auf 2-Methoxy-4-Allylphenol (Eugenol) reagiert, führt die Mutation seiner N-Glykosylierungsstelle zu einer Verhinderung des Ca^{2+} -Signals nach Stimulation mit Liganden. Außerdem konnte seine Lokalisierung an der Zellmembran im Vergleich zum Wildtyp nicht mehr nachgewiesen werden. Die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin, welches die N-Glykosylierung blockiert, führt auch zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Signals. Eine Endoglykosidasen-Behandlung zeigte die Benutzung dieser N-Glykosylierungsposition an (Katada et al., 2004).

Auch für den AT_1 -Rezeptor (Angiotensin II Rezeptor Subtyp I) konnte der Einfluss der N-Glykosylierung beim Zelloberflächentransport, aber nicht bei der Ligandenbindung nachgewiesen werden (Lanctot et al., 2005). Hier zeigt sich außerdem, dass durch Einführung zusätzlicher N-Glykosylierungsstellen in den extrazellulären und den intrazellulären Schleifen verschiedene Prozesse, wie die Zielsteuerung, Faltung, Affinität zu Liganden, Oberflächenexpression und die Qualitätskontrolle des ER beeinflusst werden. Eine Recherche in der Datenbank (<http://www.gpcr.org>) für humane nicht-orphane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ergab, dass viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in den extrazellulären Schleifen (ECL) glykosyliert sind, nämlich zu 66 % in der ECL 2, zu 14 % in der ECL 1 und zu 20 % in der ECL 3. Der AT_1 -Rezeptor wird in der

ECL 2 natürlicherweise glykosyliert (Lanctot et al., 2006). Für die Rezeptoren der Tas1R-Familie liegen keine weiteren N-Glykosylierungspositionen in den extrazellulären Schleifen (ECL) vor, gleiches gilt für den hCaSR. Der rTrx/Gprc6a wie auch der humane und Mausrezeptor besitzen eine potentielle N-Glykosylierungsstelle in der zweiten extrazellulären Schleife.

Ob die N-Glykosylierungsstellen einen Einfluss auf die Funktionalität des Rezeptors haben, wurde durch FLIPR-Experimente (**F**luorescence **I**maging **P**late **R**eader-Experimente) der Rezeptormutanten analysiert. In diesen Experimenten konnte ein Effekt der N-Glykosylierungspositionen auf die Funktion der Rezeptoren nachgewiesen werden. Die Mutation der N-Glykosylierungsposition N 130 in rTas1r3 zeigt ein stark reduziertes Ca^{2+} -Signal. Dies korreliert gut mit der Analyse dieser Mutante in den Ko-IP-Experimenten in denen keine Dimerisierung mehr mit dem Wildtyprezeptor rTas1r2 nachgewiesen werden konnte. Hier ist ein deutlicher Einfluss der N-Glykosylierung auf die Dimerisierung und damit auf die Funktion des Rezeptors zu erkennen. Die beiden weiteren N-Glykosylierungsmutanten rTas1r2_{N531Q} und rTas1r3_{N85Q}, die in den Ko-IP-Experimenten nicht mehr mit ihren jeweiligen Wildtyprezeptoren interagierten, ergaben im funktionellen Experiment eine Reduktion des Ca^{2+} -Signals auf 50%.

Die Einführung der zusätzlichen N-Glykosylierung an der Position N 58 in den rTas1r3, die bei Mäusen zwischen „Schmeckern“ und „Nicht-Schmeckern“ unterscheidet, brachte in den hier durchgeführten Experimenten zum Ausdruck, dass diese N-Glykosylierungsposition verwendet aber die Dimerisierung der Rezeptoren nicht beeinflusst wird. Max et al. (2001) erwarteten, dass eine N-verknüpfte Oligosaccharidkette an Position N 58 die Dimerisierung von rTas1r3 verhindert. Das konnte in den hier durchgeführten Experimenten nicht bestätigt werden. Diese Mutante weist jedoch, wie die meisten N-Glykosylierungsmutanten im FLIPR ein auf ca. 50% reduziertes Ca^{2+} -Signal auf (Abbildung 21).

Da unterschiedliche Einflüsse des Glykosylierungsstatus auf die Funktionalität beschrieben wurden, war unsere Hoffnung, dass wir durch Änderung der Glykosylierung der Süßgeschmacksrezeptoruntereinheiten eine bessere Oberflächenexpression und damit Funktion erreichen zu können. Dies

insbesondere auch unter dem Hintergrund der Expression in einem heterologen Zellsystem, in dem die den nativen Geschmackszellen zur Verfügung stehenden „Hilfsproteine“ zur effektiven Erlangung der Rezeptorfunktion wahrscheinlich zur Verfügung stehen. Die Ergebnisse der FLIPR-Experimente zeigen allerdings, dass keine der hergestellten N-Glykosylierungsmutante eine bessere Funktion und damit wahrscheinlich bessere Oberflächenexpression als die Wildtyprezeptoren aufweisen.

4.2 Heterodimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors

Für die Funktionalität des Süßgeschmacksrezeptors ist die Heterodimerisierung der beiden Rezeptoruntereinheiten Tas1R2 und Tas1R3 essentiell. Um dieses zu beweisen, wurden viele Expressions- und Ligandenbindungsstudien durchgeführt (Nelson et al., 2001; Lewcock & Reed, 2001; Li et al., 2001; Grünewald et al., 2002). Die Fähigkeit vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zur Dimerisierung (Homo- oder Heterodimerisierung) kann auf biochemischem Wege durch Ko-Immünpräzipitationsexperimente gezeigt werden. Als Voraussetzung ist hier die Ko-Expression der Rezeptoren zu nennen, da die Dimerisierung bereits im ER stattfindet (Angers et al., 2002). Die Dimerisierung der GPCRs der Subfamilie C kann allgemein über mehrere verschiedene Mechanismen und Domänen des Rezeptors erfolgen: die N-terminale Domäne mit der cysteinreiche Domäne, die Transmembranregion und der intrazellulären C-terminalen Domäne (Hermans & Challiss, 2001; Bouvier, 2001).

Eine Möglichkeit die Dimerisierung von Rezeptoren zu vermitteln, besteht über Bindungen zwischen Transmembran-Domänen. Für den hCaSR ist in der fünften Transmembrandomäne ein Dimerisierungsmotiv [L(XXX)G(XXX)G(XXX)L] beschrieben und es wird spekuliert, dass dieses putative Dimerisierungsmotiv die Bildung von nicht kovalent verbundenen Dimeren des hCaSR unterstützt und/oder während post-translationaler Modifikation stabilisiert (Bai et al., 1998). Durch Sequenzvergleiche konnte festgestellt werden, dass dieses putative nicht-kovalente Dimerisierungsmotiv in der rTas1r-Familie nicht vorhanden ist.

Die zweite Variante der Rezeptordimerisierung, die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben wird, ist die Dimerisierung über intermolekulare Disulfidbrücken in der N-terminalen Domäne dieser Rezeptoren. Wie auch schon für den mGluR1, mGluR5, mGluR7 und den hCaSR untersucht worden ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors über seine sehr lange extrazelluläre N-terminale Domäne erfolgen kann. Der rTas1r2 besitzt acht und der rTas1r3 neun Cysteine außerhalb der cysteinreichen Domäne, in der neun weitere, innerhalb der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konservierte Cysteine liegen (Abbildung 29). Von diesen Cysteinen sind viele an der Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken beteiligt. Für den mGluR5 ist experimentell bewiesen, dass die ersten 17 kDa des Proteins für die Dimerisierung notwendig sind. Für den mGluR1 wird ähnliches vermutet (Okamoto et al., 1998). Außerdem konnte durch intensive Mutationsanalysen beim mGluR1 gezeigt werden, dass der Austausch von Cysteinen durch Alanine die Homodimerisierung stark beeinflusst (Tsuji et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Dimerisierung besteht über die C-terminale Domäne wie bei den GABA_B-Rezeptoren (siehe Kapitel 4.4).

Mit Ko-Immünpräzipitationsexperimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Mutation von drei verschiedenen N-Glykosylierungsstellen im rTas1r2 bzw. rTas1r3 einen Einfluss auf die Dimerisierung der Rezeptoren hat. Bei den N-Glykosylierungsmutanten rTas1r3_{N85Q} und rTas1r3_{N130Q} konnte keine Interaktion mit dem rTas1r2_{WT} nachgewiesen werden. Die N-Glykosylierungsstelle N 85 ist für die Rezeptorstabilität von rTas1r3 wichtig. Bei alleiniger Transfektion kann diese Mutante nur schlecht nachgewiesen werden (Abbildung 8). Dass diese Mutante jedoch exprimiert wird, konnte durch Ko-Immünpräzipitationsexperimente gezeigt werden (Abbildung 12). Bei der zweiten Rezeptormutante N 130 ist die fehlende Dimerisierung nicht auf seine Instabilität zurückzuführen. Diese Mutante ist stabil und ihre Expression mit dem rTas1r3_{WT} vergleichbar. Hier hängt die fehlende Dimerisierung der Rezeptoren rTas1r2_{WT} und rTas1r3_{N130Q} eventuell damit zusammen, dass die intermolekulare Disulfidbrücke am C 129 nicht mehr stabilisiert wird.

Beim hCaSR befindet sich an Position 129 ein konserviertes Cystein, das bei Mutation dazu führt, dass hCaSR nicht mehr dimerisiert. In Experimenten für den mGluR5 konnte ähnliches bestätigt werden (Ray et al., 1999; Romano et al., 2001). In diesem N-terminalen Bereich des rTas1r3 liegen vier Cysteine. C 24 liegt im putativen Signalpeptid, das während der Translokation des Rezeptors in das ER abgeschnitten wird, und somit keine weitere Rolle spielt. Die anderen drei Cysteine (C 62, C 103 und C 129) liegen in einem Bereich, der auch bei den mGluRs und hCaSR konserviert ist. Bei den mGluRs und hCaSR konnte dargestellt werden, dass zwischen C 57 und C 99 eine intramolekulare Disulfidbrücke ausgebildet wird und diese Cysteine nicht wichtig für die Dimerisierung sind, aber möglicherweise einen Einfluss auf die Ligandenbindung haben. C 129 ist bei mGluR und hCaSR wichtig für die Homodimerisierung. (Romano et al., 2001). Ähnliches könnte auch für die Heterodimerisierung des rTas1r2 und rTas1r3 gelten.

	470	480	490	500	510	520	
rTas1r3	PVLHTVGTFTNGTLQ----	LQHSKMYWPGNQVPVVSQ	CSRQC	KDGQVRRVK	GFHS	CCYDCV	
rTas1r2	NPFQSIASYSPTS	SKRLTYINNVS	WYTPNNTVPVSM	CSKSC	QPGQM	KKSVGLHPCCFEC	
hCaSR	R--YDYVHVGTW	HEGVLNIDDYKI	QMNKSGMVR	SVCS	SEPC	CLKGQIKVIRKGEVSCCWICT	
rmGluR1	Y-YNVYA--K	KGERLFIN	EELW	SGFSREVP	PFNS	CSRDC	LAGTRKGIIEGEPTCCFECV
rGABA _B R2	SREVKVGEYNA	VAADTLEI	INDTIR	FQ	GSEP	-----	
rGABA _B R1	GSYKKIGY	YDSTKDDL	SW-SK	TDKWIG	GSP	-----	

	530	540	550	560	570	580	
rTas1r3	<u>DCKAGSY</u> -RKHPDDFT	<u>CTPC</u>	GKDQWSPEKSTT	CL	PRRPKFLAWGEP	AVLSLLLLLCLVLG	
rTas1r2	DCMPGTYL	<u>NRSA</u> DEFN	CLS	CPGSMWSYKNDIT	CFQRRPTFLEWHEV	PTIVVAIL--AALG	
hCaSR	ACKENEFVQ--	DEFT	CRAC	DLGWWPNAELT	GCEPI	PVRYLEWSDIESIIAIAFSC--LG	
rmGluR1	EC	PDGEY-S	DET	DASAC	NKC	CPDDFWSNENHTSC	IAKEIEFLSWTEPF
rGABA _B R2	-----	-----	-----	PKDK	TIILEQLR	KISLPLYSILSAL----	
rGABA _B R1	-----	-----	-----	PADQ	TLVIKTFR	FLSQKLFISVSVL----	

1TMD

Abbildung 29: Sequenzvergleich der cysteinreichen Region von rTas1r2, rTas1r3, rmGluR1, rGABA_BR1, rGABA_BR2 und des hCaSR.

Ein Sequenzvergleich der cysteinreichen Domänen der Rattensequenzen von rTas1r2, rTas1r3, mGluR1, rGABA_BR1, rGABA_BR2 und des hCaSR. Die konservierten Cysteine sind rot umrandet und die N-Glykosylierungsstelle im rTas1r2 (N 531) ist blau unterlegt. Der Beginn der ersten Transmembrandomäne der Rezeptoren ist unterstrichen.

Ein weiterer konservierter Bereich ist die cysteinreiche Domäne, die die Ligandenbindungsdomäne mit der Transmembranregion verbindet. Sie enthält

innerhalb der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren neun weitere Cysteine, die mehrere intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. In Abbildung 29 ist ein Sequenzvergleich der cysteinreichen Domänen von rTas1r2, rmGluR1, rGABA_BR1, rGABA_BR2 und hCaSR gezeigt. Es ist zu erkennen, dass beiden GABA_B-Rezeptoren die cysteinreiche Domäne fehlt und dass außer den neun konservierten Cysteinen die Mehrheit der anderen AS in dieser Region nicht konserviert ist.

An Position N 531 befindet sich eine N-Glykosylierungsstelle im rTas1r2 (blau unterlegt in Abbildung 29) im Bereich dieses konservierten Sequenzabschnittes. Die Mutation der N-Glykosylierungsstelle N 531 im rTas1r2 verhindert die Dimerisierung mit dem rTas1r3_{WT}. Möglicherweise unterstützt diese Glykosylierungsstelle die Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken, die zur Bildung der cysteinreichen Domäne notwendig sind. Ihre Mutation führt somit dazu, dass der Rezeptor nicht mehr richtig gefaltet wird und nicht mehr dimerisieren kann.

Mit Hilfe von Rezeptorchimären und Aminosäure-Substitutionen im hCaSR konnte nachgewiesen werden, dass die cysteinreiche Domäne einen entscheidenden Einfluss auf die Signalübertragung vom Venus-Fliegenfallen-Modul zur 7 TMD hat, aber keinen Einfluss auf die Faltung des Venus-Fliegenfallen-Moduls und die 7 TMD, auf die Rezeptordimerisierung und die Oberflächenexpression hat (Hu et al., 2000). Für mGluR1 berichteten Okamoto et al. (1998), dass Deletionen in der extrazellulären Domäne, die den cysteinreichen Bereich betreffen, zu einer schlechteren Expression des Rezeptors führen und die Ligandenbindung verhindern. Die vollständige extrazelluläre Domäne von mGluR1 wird jedoch ins Medium sezerniert und zeigt eine ähnlich starke Ligandenbindung wie der membrangebundene Rezeptor. Die sekretierte extrazelluläre Domäne des mGluR1 wird also für die Ligandenbindung richtig gefaltet und liegt als Dimer vor. Auch hier konnte somit ein Einfluss der cysteinreichen Domäne festgestellt werden.

Während der rTas1r3 nach Western-Blot Analyse als einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von 105 kDa auftritt, läßt sich rTas1r2 bei 105 kDa detektieren. Dieser wird nach Auftrennung mittels SDS-PAGE als eine starke

Bande bei ca. 300 kDa detektiert und kann nur mit Hilfe der Ko-IP mit einer Bande von 105 kDa zusätzlich zu der Bande bei 300 kDa (siehe Abbildung 15) nachgewiesen werden. Die Bande bei 105 kDa stellt den vollständig prozessierten monomeren Rezeptor dar. Die Natur der Banden des rTas1r2, die ein deutlich höheres Molekulargewicht aufweisen, ist nicht klar. Es ist denkbar, dass weder die Detergenzienwirkung des SDS noch die reduzierenden Eigenschaften von β -Mercaptoethanol und DTT im Probenpuffer ausreichend sind, um die Disulfidbrücken und hydrophoben Wechselwirkungen lösen zu können. Solche Artefakte, die sich bei der Protein-Extraktion und bei der Vorbereitung der Proben für die SDS-PAGE bilden, sind von Angers et al. (2002) und Bouvier et al. (2001) für GPCRs beschrieben worden. Auch für den hCaSR sind dimere bzw. trimere Formen des Rezeptors beschrieben worden, die durch die Aufarbeitung der Proben entstehen (Bai et al., 1996). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass der rTas1r2 zusätzliche Chaperone oder andere Proteine benötigt, die ihn bei seiner Faltung im ER unterstützen und ihn davor schützen zu aggregieren. Diese Aggregate treten auch bei gemeinsamer Expression mit dem rTas1r3 in unterschiedlicher Form (Banden zwischen 100 und 300 kDa) auf. Wie schon in Kapitel 3.1.3 angedeutet, sind für die Dimerisierung spezielle Anforderungen nötig. Nach Ko-Expression von rTas1r2 (Wildtyp oder N-Glykosylierungsmutanten) mit dem rTas1r3_{WT}, können nur die rTas1r2-Mutanten mit rTas1r3_{WT} präzipitiert werden, die offenbar richtig gefaltet und glykosyliert sind. Fehlgefaltete Proteine verbleiben im Überstand (Abbildung 11).

Um diesen Sachverhalt für den rTas1r2 noch näher zu untersuchen, müssen weitere Experimente durchgeführt werden wie z.B. die Transfektion zusätzlicher Proteine (wie RAMPs [*receptor activity modifying proteins*]). Möglicherweise wäre eine zusätzliche Änderung des Expressionssystems hingehend zu einem System, das dem einer Geschmackssinneszelle eher entspricht, zu überlegen. Ziel ist eine bessere Zelloberflächenexpression der Rezeptoren.

4.3 Intrazelluläre Lokalisierung und Transport des Süßgeschmacksrezeptors zur Zelloberfläche

Chemosensorische Rezeptoren werden in einem heterologen Expressionssystem nur schlecht an die Zelloberfläche transportiert. In dieser Arbeit konnte mittels Ko-Immunpräzipitationen und Immunfluoreszenz dargestellt werden, dass der Hauptanteil des rTas1r2 und rTas1r3 im Endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert ist und nur in nicht nachweisbaren Mengen an die Plasmamembran transportiert wird.

Durch Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit einer den Süßgeschmacksrezeptor stabil exprimierenden Zell-Linie und nachfolgendem Nachweis verschiedener ER-Marker Proteine konnte gezeigt werden, dass mit den Rezeptoren rTas1r2 und rTas1r3 die ER-Proteine Calnexin, Calreticulin und BiP/GRP78 präzipitiert werden können. Diese drei Proteine gehören zu der Qualitätskontrolle des ER, wobei sie dort unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Calnexin und Calreticulin gehören zu den Lektinen, die spezifisch transient an unterschiedlich prozessierte Oligosaccharidzwischenstufen binden, die einen terminalen einfachen Zuckerrest (wie z.B.: $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) besitzen (Hammond et al., 1994; Ou et al., 1993; Spiro et al., 1996; Ware et al., 1995). Fehlgefaltete oder nicht richtig zusammengesetzte Proteine verbleiben im ER und zeigen zusätzlich eine verlängerte Interaktion mit diesen Chaperonen. In der Immunfluoreszenz konnte die Ko-Lokalisation mit Calnexin ebenfalls bestätigt werden, während eine nur geringe Ko-Lokalisation mit dem Golgi-Marker GM130 nachweisbar war. Dies spricht zusammen mit den Endo H sensitiven Oligosaccharidketten beim rTas1r3 und rTas1r2 dafür, dass diese nicht aus dem ER in den Golgi-Apparat transportiert werden. In einer Diplomarbeit (durchgeführt von Irina Kempel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Schmale) konnte für die extrazelluläre Domäne des rTas1r3 eine Interaktion mit BiP/GRP78 (*immunoglobulin heavy chain binding protein/glucose regulated protein 78*) mittels Q-TOF Massenspektroskopie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Es kann daraus gefolgert werden, dass der Süßgeschmacksrezeptor verstärkt im ER vorliegt. Diese Tatsache spricht dafür, dass biochemische Untersuchungen an

diesen Rezeptoren in einem veränderten heterologen System durchgeführt werden sollten. Ein solches heterologes System sollte der natürlichen Umgebung der Rezeptoren ähnlicher sein. Funktionelle Untersuchungen können jedoch weiter in dem hier verwendeten heterologen System der HEK293-Zellen durchgeführt werden, da die geringen Mengen der Rezeptoren an der Zelloberfläche hierfür ausreichend sind.

Auch andere chemosensorische Rezeptoren, wie der olfaktorische Rezeptor mOR-EG (reagiert auf Eugenol), zeigen ein ähnliches Verhalten wie der Süßgeschmacksrezeptor. mOR-EG wird in nicht detektierbaren Mengen an die Plasmamembran transportiert. Außerdem konnte für ihn eine Interaktion mit Calnexin in Ko-Immunpräzipitationsexperimenten und eine Ko-Lokalisation mit Calnexin und Calreticulin durch Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Weiter konnte durch Endoglykosidasen-Behandlung gezeigt werden, dass mOR-EG nur mit mannosereichen Zuckerketten modifiziert wird, welches für seinen Verbleib im ER spricht. Durch weitere Experimente mit Cycloheximid und Proteasom-Inhibitoren wurde der Abbau von mOR-EG durch das Proteasom nachgewiesen. Daraus folgt, dass mOR-EG aufgrund schlechter Faltung im ER verbleibt, durch das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut oder in ER-Aggregaten angereichert wird, die durch Autophagie degradiert werden (Lu et al., 2003). Dabei sind die letzten beiden Punkte für den Süßgeschmacksrezeptor nicht untersucht worden.

Für den WT und nicht-glykosylierten (ng) AT₁-Rezeptor konnte dargestellt werden, dass er mit den ER-Qualitätskontrollproteinen Calnexin, Calreticulin und BiP/GRP78 interagiert und dass die ER-Mannosidase I für seine Oberflächenexpression wichtig ist (Lanctot et al., 2005, 2006). Lanctot et al. (2005; 2006) stellten die Hypothese auf, dass fehlgefaltete Rezeptoren größere hydrophobe Bereiche besitzen und somit ins Zytosol zurücktransportiert und anschließend durch das Proteasom abgebaut werden. In ihren Experimenten mit dem AT₁-Rezeptor konnte eine Interaktion mit HSP 70, einem zytosolischen Protein der *heatshock*-Familie, nachgewiesen werden. Es konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden, ob die Interaktion mit dem zytoplasmatischen oder mit dem AT₁-Rezeptor, der in der ER-Membran eingebaut ist, stattfindet. Das

gleiche Ergebnis erhielten sie auch für den nichtglykosylierten AT₁-Rezeptor. Für dessen Verhalten bezweifeln die Autoren jedoch dass es sich um eine Interaktion mit der ins Zytosol zurücktransportierten und durch das Proteasom abgebauten Rezeptormutante handelt, da sowohl der nichtglykosylierte AT₁-Rezeptor (wenn auch schlechter) als auch der Wildtyp-Rezeptor an die Plasmamembran transportiert werden. An diesem Beispiel des AT₁-Rezeptors bzw. seiner nichtglykosylierten Mutante ist die normale Interaktion mit den ER-Chaperonen gezeigt. Bei rTas1r2 und rTas1r3 ist die fehlende/ schwache Interaktion mit GM130 wichtiger. Für den Rhodopsinrezeptor und CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) konnte die Interaktion mit HSP 70 ebenfalls gezeigt werden (Chapple et al., 2003; Meacham et al., 1999). In dieser Arbeit konnte dies für den Süßgeschmacksrezeptor durch Ko-IP Experimente nicht nachgewiesen werden.

Die funktionelle Charakterisierung von chemosensorischen Rezeptoren wird durch deren heterologe Expression in HEK293-Zellen durchgeführt. Ihr Transport und damit auch der des Süßgeschmacksrezeptors, ist sehr schlecht, so dass nur wenige Rezeptoren an der Zellmembran lokalisiert sind. Dies ist aber eine wichtige Voraussetzung für die Interaktion mit ihren Liganden. Für einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weiß man, dass sie zusätzliche Proteine für ihre korrekte Zielsteuerung benötigen. Diese gehören z.B. zu den drei Familien REEPs (*receptor expressing enhancing proteins*), RTPs (*receptor transporting proteins*) und RAMPs (*receptor activity modifying proteins*). Beim hCaSR konnte von Bouschet et al. (2005) gezeigt werden, dass RAMP1 und RAMP3 gemeinsam die Oberflächenexpression fördern, wozu RAMP1 alleine nicht ausreichend ist. RAMP3 fördert zudem die Translokation des hCaSR aus dem ER in den Golgi-Komplex und dessen Glykosylierung. In HEK293-Zellen wird endogen nur RAMP1 exprimiert.

RTPs und REEPs haben in Untersuchungen für olfaktorische Rezeptoren (ORs) und Bitterrezeptoren (Tas2R) ihren Einfluss auf deren Expression deutlich gemacht. Experimente von Saito et al. (2004) weisen daraufhin, dass RTP1 und RTP2 die Expression von olfaktorischen Rezeptoren fördern und deuten zusätzlich deren Rolle bei der Translokation und Funktion dieser Rezeptoren an.

Ähnliches konnte auch für den Bitterrezeptor hTAS2R16 dokumentiert werden. Hier erhöhte die Ko-Expression mit RTP oder REEP Proteinen die Agonisten-Stimulation, welches wahrscheinlich durch eine bessere Oberflächenexpression zustande kommt. Außerdem wurde durch Ko-Immunpräzipitationen eine direkte Interaktion mit RTP3 bzw. 4 und hTAS2R16 nachgewiesen. Gleichzeitig wurde die Genexpression von RTP3 und 4 in humanen Geweben der circumvallaten Papille und des Testis, in denen auch hTAS2R16 exprimiert wird, aufgezeigt. Für den humanen Süßgeschmacksrezeptor (hTAS1R2+hTAS1R3) konnte in funktionellen Experimenten kein Einfluss von RTP und REEP nachgewiesen werden (Behrens et al., 2006). In HEK293-Zellen konnte durch RT-PCR belegt werden, dass REEP2-6, aber keine RTPs endogen exprimiert werden (Behrens et al., 2006).

Aus diesen experimentellen Ergebnissen für andere chemosensorische Rezeptoren ergeben sich Rückschlüsse für weitere Experimente, um den Einfluss dieser Proteine auf den rTas1r2 und rTas1r3 zu untersuchen. Hierzu könnten Proteine der RTP-, RAMP bzw. REEP-Familie ko-transfiziert werden, um den Transport des Süßgeschmacksrezeptors an die Zelloberfläche zu verbessern. Möglicherweise müsste zusätzlich nach weiteren bisher unbekannt Proteinen gesucht werden, die diese Aufgabe beim Süßgeschmacksrezeptor übernehmen oder das Expressionssystem könnte gewechselt werden.

4.4 Einfluss der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung, Funktionalität und Lokalisierung des Süßgeschmacksrezeptors

Durch separate und Ko-Expression der Rezeptoren konnte keine eindeutige Plasmamembranlokalisierung nachgewiesen werden. Tas1R2 und Tas1R3 werden überwiegend in intrazellulären Kompartimenten, wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) angereichert. Diese Gemeinsamkeit der ER-Lokalisierung zeigen auch die GABA_B-Rezeptoren (*γ-aminobutyric acid_B receptor*). Hier wurde durch Expression der Rezeptoruntereinheiten belegt, dass die Heterodimerisierung für den Transport zur Plasmamembran notwendig ist. Dabei befinden sich die beiden Varianten des GABA_BR1a und GABA_BR1b im ER.

Nur der GABA_BR2 wird zur Membran transportiert, wo er aber nur eine schwache Agonistenbindung zeigt (Couve et al., 1998). Bei dem GABA_B-Rezeptor konnte die für die Heterodimerisierung essentielle Proteindomäne durch Experimente im Hefe-Zwei-Hybrid System nachgewiesen werden (Kuner et al., 1999). Die Dimerisierung der GABA_B-Rezeptoren findet über ihre C-terminale Domäne mittels Ausbildung einer parallelen coiled-coil α -Helix statt (Kammerer et al., 1999). GABA_BR1 wird wegen eines ER-Retentionssignales [RXR(R)] im ER zurückgehalten (Margeta-Mitrovic et al., 2000). Nur durch Ko-Transfektion beider Rezeptoren in einem heterologen Expressionssystem kann ein Transport an die Zelloberfläche gezeigt werden. Hier wird also das ER-Retentionssignal durch die Interaktion maskiert (White et al., 1998; Margeta-Mitrovic et al., 2000).

Hefe-Interaktionsexperimente mit den C-terminalen Domäne von rTas1r2 und rTas1r3 und Datenbankanalysen (N. Burhenne, 2003) gaben Hinweise darauf, dass die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors nicht über die C-terminale Domäne erfolgt. Um dieses im heterologen Expressionssystem zu bestätigen, wurden in dieser Arbeit Ko-Immunpräzipitationen mit Rezeptoren durchgeführt, deren C-terminale Domäne deletiert war (Abbildung 15). Diese Experimente haben dokumentiert, dass eine Dimerisierung des Rezeptors weiterhin möglich war. Daraus kann, zusammen mit den Hefeexperimenten, abgeleitet werden, dass die Heterodimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors nicht über seine C-terminale Domäne vermittelt wird.

Die an der C-terminalen Domäne deletierten Rezeptoren rTas1r2 und rTas1r3 sind hauptsächlich im ER und nicht an der Plasmamembran lokalisiert (Abbildung 17). Dies wird durch die Ko-Lokalisation mit Calnexin deutlich, außerdem ist nur ein schwacher Nachweis mit dem Golgi-Marker GM 130 zu erkennen. Die ER-Lokalisation des Süßgeschmacksrezeptors ist nicht auf ein ER-Retentionssignal zurückzuführen, weder auf eines, das dem Motiv [RXR(R)] des GABA_B-Rezeptors entspricht, noch auf ein vergleichbares Motiv.

Auch für den mOR-EG wurde beschrieben, dass Deletionen der C-terminalen Domäne keinen Einfluss auf seine Plasmamembranlokalisation und somit seinen Transport haben, während Modifikationen, z.B. ein C-terminales

Antikörperepitop oder Rezeptor-Chimären mit der C-terminalen Domäne des Rhodopsins, keine funktionelle Aktivität mehr zeigen. Die C-terminale Domäne des olfaktorischen Rezeptors mOR-EG ist wichtig für seine richtige Faltung, die für die G-Proteininteraktion essentiell ist (Katada et al., 2004).

Durch funktionelle Experimente konnte in dieser Arbeit dargestellt werden, dass die Deletion der C-terminalen Domänen zu einer Reduktion des Ca^{2+} -Signals führt. Für die Kombination aus rTas1r2 Δ C/rTas1r3_{WT} wurde eine Reduktion des Ca^{2+} -Signals um ca. 50% nachgewiesen. Bei der anderen Rezeptorkombination, rTas1r2_{WT}/ rTas1r3 Δ C, war der Effekt noch deutlicher, dort reduzierte sich das Ca^{2+} -Signal um ca. 90%. Dies spricht für eine mögliche Schwächung der Interaktion der Rezeptoren mit dem G-Protein, die für den rTas1r3 Δ C stärker ist. Möglicherweise findet die G-Protein-Bindung hauptsächlich mit der C-terminalen Domäne des rTas1r3 statt. Für den GABA_B-Rezeptor wird auch eine Aufgabenteilung der Rezeptoruntereinheiten beobachtet. Hier ist die GABA-R2-Untereinheit für die Maskierung des ER-Retentionssignales der GABA-R1-Untereinheit notwendig, während diese GABA-R1-Untereinheit für die Aktivierung durch seinen Agonisten GABA benötigt wird (Cuve et al., 1998, Margeta-Mitrovic et al., 2000).

Beim hCaSR, der eine längere C-terminale Domäne besitzt als rTas1r2 bzw. rTas1r3, sind die Aminosäuren (AS) zwischen Position 863 und 946 wichtig für die normale Rezeptorfunktion (Bai et al., 1997; Lienhardt et al., 2000). Deletionen der AS 863, 865, 874 oder 877 der C-terminalen Domäne des hCaSR wiesen keine funktionelle Aktivität mehr auf, aber eine normale oder erhöhte Expression im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor (Bai et al., 1997; 1998; Ray et al., 1997). Beim hCaSR kann die Phosphorylierung des Rezeptors am Thr-888 durch die Protein Kinase C (PKC) negativ die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern regulieren. Von Jiang et al. (2002) konnte dies durch eine Deletion der Aminosäure an Position 888 der C-terminalen Domäne dokumentiert werden. Aus den von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Experimenten konnten Rückschlüsse auf den Bereich der C-terminalen Domäne des hCaSR gezogen werden, der für die G-Protein Interaktion wichtig ist.

Für den Süßgeschmacksrezeptor rTas1r2 oder rTas1r3 ist es schwieriger solche Aussagen in Bezug auf den Einfluss der C-terminalen Domäne darzustellen, da die Oberflächenexpression sehr gering ist und die Rezeptoren möglicherweise weitere Proteine benötigen, um besser an die Membran transportiert zu werden. Es ist jedoch erkennbar, dass die C-terminale Domäne einen Einfluss auf die Signaltransduktion hat. Um dieses näher zu untersuchen, müssten weitere Mutationsanalysen an der C-terminalen Domäne der Rezeptoren durchgeführt werden.

4.5 rFhl-2, ein möglicher neuer Interaktionspartner des rTas1r1 und rTas1r2

C-terminal interagierende Proteine spielen eine große Rolle bei GPCRs und sind schon eingehender für andere GPCRs untersucht worden. Für das System der Geschmacksrezeptoren sind nur wenig Proteine bekannt, die mit der C-terminalen Domäne interagieren. Um solche Interaktionspartner zu finden, sind verschiedene experimentelle Untersuchungen möglich: 1. Hefe-Zwei-Hybrid System, 2. Gel-overlay Assay oder 3. Proteomanalyse. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen rTas1r1-ct und rTas1r2-ct mit dem rFhl-2 untersucht. Dieser Interaktionspartner wurde in einem Hefe-Zwei-Hybrid Screen, durchgeführt unter Verwendung einer humanen Keratinozyten-Bibliothek, gefunden. Dieser Screen wurde von Gabriel Frank in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Schmale durchgeführt.

Für FHL-2 werden auch die synonymen Namen DRAL (*down-regulated in rhabdomyosarcomas LIM domain protein*) und SLIM3 (*skeletal muscle LIM-protein*) benutzt (Scholl et al., 2000). In Abbildung 22 ist die Domänenstruktur des FHL-2 Proteins gezeigt. Das Protein besitzt vier vollständig und eine halbe LIM-Domäne, gehört in die Familie der LIM-Domänen Proteine und dort in die Klasse der LMO (LIM-only). Die LIM-Domäne ist eine Cystein-Histidinreiche Doppelzinkfingerstruktur und wird als eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne benutzt.

Das FHL2-Gen besitzt 5 Exone, die für eine ~1.5 kb RNA kodieren, welche zu einem Protein von 279 Aminosäuren translatiert wird. Es ist evolutionell stark

konserviert und Orthologe werden in *C. elegans*, *D. melanogaster* usw. gefunden. FHL-2 besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen und eine O-Glykosylierungsstelle. Es sind weitere Konsensusmotive für Ubiquitinylierung, Sumoylierung, Methylierung und Acetylierung vorhanden, aber diese Modifikationen sind noch nicht experimentell untersucht worden (Johannessen et al., 2006). Das hFHL-2 besitzt zusätzlich eine proteolytische Sequenz (YEKQHAMQ) zwischen LIM2 und LIM3, deren biologische Rolle noch unklar scheint (ElMourabit et al., 2003) und die das Rattenortholog nicht besitzt.

Die Familie der FHL-Proteine umfasst die Mitglieder FHL-1, FHL-2, FHL-3, FHL-4 und ACT. In Abbildung 30 ist der Verwandtschaftsgrad der FHL-Familie der Spezies Mensch, Maus und Ratte in einem phylogenetischen Stammbaum dargestellt. Zu erkennen ist, dass FHL-3 verwandtschaftlich weiter von den übrigen Mitgliedern der Proteinfamilie entfernt liegt. Außerdem sind sich die Mitglieder FHL-2 und ACT und FHL-1 und FHL-4 ähnlicher. Diese Ergebnisse gehen einher mit der Hypothese, dass die FHL-Genfamilie während der Evolution durch Duplikation eines einzelnen Urgens entstanden ist (Fimia et al., 2000).

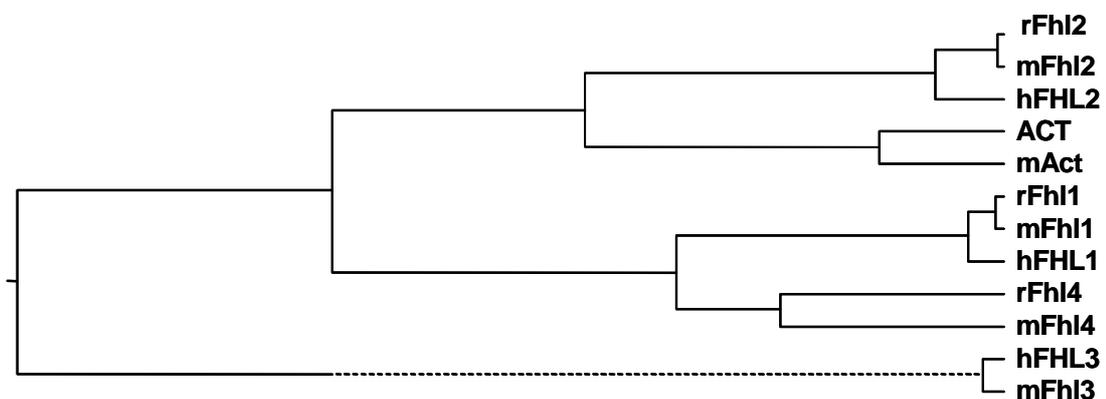


Abbildung 30: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad innerhalb der FHL-Familie.

Dargestellt ist der phylogenetische Verwandtschaftsgrad in der FHL-Familie in einem Dendrogramm (die Auswertung erfolgte mit dem Software-Programm DNASTAR). Verwendet wurden hierfür die Aminosäuresequenzen von hFHL-1, hFHL-2, hFHL-3, ACT, mFhl-1, mFhl-2, mFhl-3, mFhl-4, mACT, rFhl-1, rFhl-2 und rFhl-4.

Die Mitglieder der Proteinfamilie weisen zell-, gewebe- und entwicklungs-spezifische Expressionsmuster auf und zeigen somit ihren Einfluss auf ver-

schiedene zelluläre Prozesse, wie z.B. Zellwachstum, Transkription und Signaltransduktion. FHL-4 und ACT werden testisspezifisch und zeitabhängig (zusammen mit CREM) während der Entwicklung der Spermazellendifferenzierung exprimiert. FHL-2 und FHL-3 werden hauptsächlich im Herz- und Skelettmuskel nachgewiesen, während FHL-1 eine weiter verbreitete Gewebeexpression zeigt (Fimia et al., 2000; Johannessen et al., 2006).

In mFhl-2-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Tiere eine normale Lebenserwartung besitzen und keinen abnormalen Herz-Phänotyp aufweisen (Chu et al., 2000; Kong et al., 2001). Kong et al (2001) beschreiben weiterhin, dass weitere LIM-Proteine (mFhl-1 und mFHL-3) im Herzen dieser Mäuse exprimiert werden, jedoch keine erhöhte mRNA-Expression nachweisbar ist.

Um die gefundene Interaktion zu bestätigen und näher zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit weitere Experimente durchgeführt, zuerst im Hefe-System und anschließend in einem heterologen Expressionssystem.

4.5.1 Überprüfung der Spezifität der Bindung und Identifizierung der die Bindung vermittelnden Domäne des FHL-2

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperimente konnte dargestellt werden, dass das rFhl-2 mit der C-terminalen Domäne des rTas1r1 und rTas1r2, aber nicht mit rTas1r3 interagiert. Die LIM-Domäne ist schon vorher als Protein-Protein-Interaktionsdomäne beschrieben worden, so dass die interaktionsvermittelnde Domäne mittels verschiedener Deletionsmutanten im Hefesystem ermittelt werden konnte. In diesen Experimenten konnte dokumentiert werden, dass die vierte LIM-Domäne für die Bindung an der C-terminalen Domäne von rTas1r1 und rTas1r2 nicht gebraucht wird und dass die LIM-Domänen drei und vier nicht ausreichend sind, um die Interaktion zu vermitteln. Auf der anderen Seite ist die halbe und erste LIM-Domäne ausreichend, um die Interaktion einzugehen, wobei diese am stärksten ist, wenn die halbe und drei weitere LIM-Domänen vorhanden sind. Die C-terminale Domäne des rTas1r2 weist in allen Fällen eine schwächere Interaktion als rTas1r1 auf.

In der Literatur sind inzwischen mehr als 50 Proteine beschrieben, die mit FHL-2 interagieren. Viele von ihnen sind durch einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen entdeckt worden. Sie gehören zu verschiedenen Protein-Klassen wie Rezeptoren, strukturellen Proteinen, Signalproteinen, Transkriptions- und Ko-Faktoren, Splicingfaktoren, DNA-Replikations- und Reperaturenzymen sowie metabolischen Enzymen. Dies macht deutlich, dass das FHL-2 an vielen Prozessen beteiligt ist, wobei die funktionelle und biologische Relevanz noch unbekannt ist (für einen Überblick Johannessen et al., 2006).

Sun et al. (2006) beschreiben hFHL-2 als einen Interaktionspartner der Sphingosinkinase-1. Hier konnte im Hefe-System, anders als die in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen, nachgewiesen werden, dass für die Interaktion die LIM-Domänen 1-4 in den Konstrukten vorhanden sein müssen. Andere Arbeitsgruppen konnten im Hefe-System zeigen, dass DRAL/FHL2 mit den zytoplasmatischen Domänen von α_{3A} , α_{3A} , α_{3A} und verschiedenen β -Integrin-Untereinheiten interagiert. Für diese Interaktionen sind unterschiedliche LIM-Domänen verantwortlich (Wixler et al. 2000; Samson et al., 2004).

4.5.2 Ko-Expression und Ko-Lokalisation des potentiellen Interaktionspartners rFhl-2

Die im Hefe-Zwei-Hybrid System gefundene und näher charakterisierte Interaktion zwischen rTas1r1-ct bzw. rTas1r2-ct und rFhl-2 sollte in weiteren Experimenten in einem heterologen Zellkultursystem bestätigt werden. Hierfür wurden Ko-Expressions- und Ko-Lokalisationsexperimente durchgeführt. Für die Ko-Expressionsexperimente wurden HEK293-Zellen mit den entsprechenden Konstrukten transient ko-transfiziert und diese anschließend ko-immunpräzipitiert. Diese Experimente erfolgten zunächst in Anlehnung an die Hefe-Experimente mit der C-terminalen Domäne von rTas1r1, -2 und -3. Hier konnte kein Nachweis für eine Interaktion erbracht werden. Auch durch den Einsatz unterschiedlicher Epitop-markierter rFhl-2 Konstrukte (N- bzw. C-terminale Epitop-Markierung) und verschiedener Versuchsbedingungen (EDTA- bzw. Zn^{2+} -Ionen-Zusatz im Co-IP-Puffer) konnte die Interaktion nicht bestätigt werden (Abbildung 25).

Weitere Experimente wurden mit einer den Süßgeschmacksrezeptor stabil exprimierenden Zell-Linie durchgeführt. Auch hier konnte die Interaktion nicht gezeigt werden (Abbildung 26). Durch Ko-Lokalisations-Experimente in dieser Zell-Linie konnte nachgewiesen werden, dass rFhl-2 in einer zytoplasmatischen Verteilung exprimiert wird und nicht dem Expressionsmuster der Rezeptoruntereinheiten rTas1r2 und rTas1r3 folgt (Abbildung 27 und Abbildung 28).

Die erhaltenen Ergebnisse dokumentieren, wie wichtig es ist die gefundenen Ergebnisse durch verschiedene experimentelle Ansätze zu bestätigen. Für das Hefe-System ist das Vorkommen von falsch-positiven Interaktionspartnern schon bekannt. Daher ist der entscheidende Schritt nach der Isolierung eines interagierenden Proteins der Nachweis der Interaktion durch unabhängige Methoden. Außerdem muss die funktionelle Bedeutung der Interaktion nachgewiesen werden. Die Bestätigung der Interaktion *in vivo* ist unumgänglich, da im Hefe-2-Hybrid-System Fusionsproteine aus verschiedenen Zellkompartimenten oder aus unterschiedlichen Entwicklungs- und Differenzierungsstufen zur Interaktion mit dem Köderprotein fähig sind, deren Wechselwirkungen in der Zelle aufgrund subzellulärer Kompartimentierung oder differentieller Genexpression nicht möglich wären (Fields & Sternglanz, 1994). Unter falsch-positiven Interaktionspartnern versteht man außerdem Proteine, die zur Expression der Reportergene führen, indem sie entweder ohne Interaktion mit einem Köderprotein die Transkription bewirken (autoaktiv) oder indem sie unspezifisch mit dem Köderprotein interagieren (falsch positiv). Diese Interaktionspartner sind dafür bekannt, in verschiedenen Screens und unabhängig vom verwendeten Köderprotein isoliert zu werden. Für das FHL-2 sind jedoch schon verschiedene Interaktionspartner beschrieben worden, die mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens gefunden und als positive Interaktionen bestätigt worden sind (Wixler et al. 2000; Scholl et al., 2000; Sun et al., 2006).

Der Nachweis der Interaktionen zwischen Plasmamembranproteinen und damit assoziierten Proteinen mit Hilfe von Ko-IPs ist in der Regel schwierig. Grund hierfür ist, dass eine gewisse Konzentration an Detergenz im Puffer enthalten sein muss, um die Membranproteine aus der Membran herauszulösen

und sie in Lösung zu halten. Ist die Konzentration an Detergenz allerdings zu hoch, stört dies die Wechselwirkung zwischen den Proteinen. Auch die Salzkonzentration muss so gewählt werden, dass keine Proteinaggregate entstehen und die Protein-Protein-Wechselwirkungen erhalten bleiben. Daher muss zur erfolgreichen Ko-Präzipitation in der Regel eine Vielzahl von Puffern mit verschiedenen Konzentrationen an Detergenzien und Salzen ausgetestet werden (Rehm, 2002). Dies ist auch in dieser Arbeit geschehen, führte jedoch nicht zu positiven Ergebnissen mit dem gefundenen Interaktionspartner rFhl-2. Hierbei könnten noch weitere Gründe eine Rolle spielen, z. B. bei der Verwendung der C-terminalen Domänen von rTas1r1, -2 bzw. -3, die nur sehr schlecht exprimiert werden, oft in Aggregaten vorliegen und somit die Interaktion möglicherweise verhindern. Daher wurden für die weiteren Experimente die gesamte Rezeptoruntereinheit von rTas1r2 und rTas1r3 eingesetzt. Bei diesen Rezeptoren gibt es auch verschiedene Gründe für den fehlenden Nachweis der Interaktion. Für diese Experimente wurde eine Zell-Linie verwendet, die diese Rezeptoren stabil exprimiert und somit die Transfektionseffizienz keine Rolle spielt. Beide Rezeptoren tragen jedoch ein C-terminales Antikörper-Epitop, welches die Interaktion verhindern könnte und somit eine mögliche Erklärung für den negativen Nachweis darstellt. Um dies näher zu untersuchen, könnte im Hefe-System die Bindungsdomäne bzw. Aktivator-domäne C-terminal an die C-terminalen Domänen der Rezeptoren von rTas1r1, -2 bzw. -3 fusioniert werden oder das in der Zellkultur verwendete Antikörper-Epitop fusioniert an die C-terminalen Domänen der Rezeptoren getestet werden. In den hier durchgeführten Hefe-Experimenten waren die Bindungsdomäne bzw. Aktivator-domäne N-terminal an die C-terminalen Domänen der rTas1r fusioniert. In den Hefe-Experimenten lag die terminale Domäne der rTas1r frei vor. Weiter werden diese Rezeptoren nur sehr schlecht zur Zellmembran transportiert und wenn die Interaktion an der Plasmamembran lokalisiert ist, ist sie aufgrund der zu geringen Zahl von Interaktionspartnern nicht nachzuweisen. Außerdem wird FHL-2 in den verwendeten HEK293-Zellen ubiquitär exprimiert (Abbildung 24). Somit findet eine Konkurrenzreaktion zwischen endogenem hFHL-2 und Epitop-markiertem rFhl-2 statt. In den

durchgeführten Experimenten wurde jedoch nur das Epitop-markierte transfizierte rFhl-2 nachgewiesen. Daher könnte die Interaktion zwischen dem endogenen hFHL-2 und den verschiedenen eingesetzten Rezeptorkonstrukten nicht detektiert worden sein. Weiterhin erscheinen weitere Experimente mit dem rTas1r1 sinnvoll, da die Interaktion mit dieser Rezeptoruntereinheit im Hefe-System am stärksten war.

Wenn alle diese weiteren experimentellen Ansätze keine positive Interaktion zwischen rFhl-2 und rTas1r1-ct bzw. rTas1r2-ct zeigen sollten, ist diese Interaktion als eine falsch-positive Interaktion einzuordnen. Um weitere C-terminale Interaktionspartner für die rTas1r-Familie zu finden, wäre desweiteren zu überlegen, auf andere experimentelle Ansätze zurück zu greifen, wie z. B. Pulldown-Experimenten in einer Zell-Linie durchgeführt werden, die der natürlichen Umgebung des Geschmacksystems besser entspricht, die es aber noch nicht gibt.

5 Zusammenfassung

Die Geschmackswahrnehmung wird durch definierte Signaltransduktionswege – Ionenkanäle und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) – von Geschmackszellen, die sich in Geschmacksknospen auf der Zunge und dem Gaumen befinden, vermittelt. Die Tas1R-Rezeptorfamilie, aus deren Untereinheiten die Süß- und umami-Rezeptoren gebildet werden, besitzt drei Mitglieder, Tas1R1, Tas1R2 und Tas1R3. Sie gehören zur Subgruppe C der GPCRs, zu denen z. B. auch die metabotropen Glutamatrezeptoren zählen. Auffallend bei den Rezeptoren der rTas1r-Familie ist die lange N-terminale Domäne, die auch als „Venus-Fliegenfallen-Modul“ bezeichnet wird und über den die Ligandenbindung erfolgt, sowie seine kurze C-terminale Domäne, die wichtig für die Signaltransduktion ist.

Vorarbeiten haben gezeigt, dass Süßgeschmacksrezeptoruntereinheiten und ihre N-terminalen Domänen als sekretorische Proteine exprimiert werden können, aber nicht effektiv entlang des sekretorischen Weges transportiert werden. Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der N-Glykosylierung und der C-terminalen Domäne auf die Dimerisierung, die Lokalisierung und die Funktionalität des Süßgeschmacksrezeptors zu untersuchen. Beide Rezeptoren rTas1r2 und rTas1r3 besitzen jeweils neun potentielle N-Glykosylierungspositionen, die durch gerichtete Mutagenese von N zu Q mutiert worden sind. Durch Endoglykosidasen-Behandlung konnte gezeigt werden, dass rTas1r3 und seine Mutanten mit mannosereichen Zuckerketten modifiziert worden sind. Dies zeigt ihren unvollständigen Transport aus dem ER in den Golgi-Komplex, welches für die Wildtyprezeptoren durch Ko-Immünpräzipitation (Ko-IPs) mit den ER-Markern Calnexin, Calreticulin und BiP/GRP78 bestätigt werden konnte.

Die Fähigkeit der Mutanten zur Dimerisierung wurde durch Ko-IPs überprüft. Es zeigten sich drei Mutanten (rTas1r2_{N531Q}, rTas1r3_{N85Q} und rTas1r3_{N130Q}) die jeweils nicht mehr mit dem Wildtyprezeptor dimerisierten. Die beiden Mutanten rTas1r2_{N531Q}, rTas1r3_{N85Q} können aufgrund fehlender Stabilität keine funktionellen Dimere mehr bilden, während die Dimerisierung der dritten Rezeptormutante rTas1r3_{N130Q} aufgrund der Lage der Glykosylierungsstelle in

der Nähe einer intermolekularen Disulfidbrücke am C 129 möglicherweise verhindert wird. Die Funktion der mutierten Rezeptoren wurde durch fluorimetrische intrazelluläre Ca^{2+} -Bestimmung im FLIPR (in Kollaboration mit dem Labor v. Prof. W. Meyerhof, DIfE) untersucht. Nach Transfektion in HEK293-Zellen, die stabil $G_{\alpha 16\text{gust}44}$ exprimieren, zeigten die Rezeptormutanten, die nicht mehr dimerisierten, nach Gabe des Süßliganden Steviosid ein reduziertes Ca^{2+} -Signal. Besonders stark war die Reduktion des Ca^{2+} -Signals der Mutante rTas1r3_{N130Q}. Eine zusätzlich eingeführte N-Glykosylierungsstelle an der Position N 58 zeigte keine Beeinflussung der Dimerisierung jedoch eine Reduktion des Ca^{2+} -Signals im FLIPR. Rezeptoren, die an der C-terminalen Domäne deletiert wurden, zeigen weiterhin ihre Fähigkeit zur Dimerisierung, so dass daraus geschlossen werden kann, dass sich die Domäne für eine Dimerisierung nicht im Bereich der C-terminalen Domäne der Rezeptoren befindet. Experimente zu ihren funktionellen Eigenschaften zeigen ein deutlich reduziertes Ca^{2+} -Signal, so dass zu vermuten ist, dass die G-Protein Bindung in diesem Bereich des Rezeptors erfolgt und durch die Deletion der C-terminalen Domäne behindert wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Proteininteraktion von rFhl-2, einem Mitglied der FHL-Familie, mit der C-terminalen Domäne von rTas1r1, rTas1r2 und rTas1r3 zunächst im Hefe-System näher untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die halbe und die erste LIM-Domäne für eine Interaktion ausreichend sind und die Interaktion mit dem rTas1r1-ct stärker ist. Keine Interaktion konnte mit der C-terminalen Domäne von rTas1r3 nachgewiesen werden. Die Expression von rFhl-2 in sensorischen und nicht-sensorischen Geweben konnte mittels RT-PCR gezeigt werden. Der Nachweis einer Interaktion in einem heterologen Zellkultursystem konnte weder mit der C-terminalen Domäne von rTas1r1, -2 und -3 noch mit einer den Süßgeschmacksrezeptor stabil exprimierenden Zell-Linie erbracht werden.

6 Summary

The perception of taste is mediated by defined transduction pathways involving ion channels and G-protein-coupled membrane receptors (GPCRs) of taste cells located in taste buds on the tongue and the palate. The Tas1R family of sweet and umami receptors consists of three subunits, Tas1R1, Tas1R2 and Tas1R3. These receptors belong to the subfamily C of the GPCRs along with e.g. metabotropic glutamate receptors and feature an extended N-terminal binding site, the "Venus-Fly-Trap-Module" and a relatively short intracellular domain for signal transduction.

Previous results of our group and others have shown, that sweet taste receptors and their N-terminal domains expressed as secretory proteins are inefficiently transported through the intracellular compartments towards the sites of plasma membrane insertion or secretion, respectively. The N-terminal domains of the sweet taste receptors exhibit several consensus sites of glycosylation. Both receptors rTas1r2 and rTas1r3 have nine potential glycosylation sites and to this end, we began to exchange the amino acid residues of the glycosylation sites in the rTas1r2 and rTas1r3 from N to Q by site directed mutagenesis. Our results suggest that all the glycosylation sites were used. In general the glycosylation was Endo H sensitive pointing to an incomplete transport of the receptor from the ER to Golgi compartments. These results were confirmed by Co-IP analysis with the ER marker proteins calnexin, calreticulin und Bip/Grp78. The ability of the receptor mutants to form dimers was tested with Ko-IPs. The results had shown that the mutants rTas1r2_{N531Q}, rTas1r3_{N85Q} and rTas1r3_{N130Q} could not dimerize as a result of loss of the receptor stability for the mutants rTas1r2_{N531Q}, rTas1r3_{N85Q} and of the location of the N-glycosylation site near an intermolecular disulfide-bridge at the position C 129 for the mutant rTas1r3_{N130Q}. Further we tested the function of the mutated receptors in a fluorimetric intracellular Ca²⁺-assay, using the FLIPR (in collaboration with the Meyerhof lab, Dife). HEK293 cells stably expressing G_{α.16gust44} were transfected with combinations of the wildtype and the mutated receptors. The combinations, which lost their ability to dimerize, gave a reduced

signal compared with the wildtype receptors when we used steviosid as a sweet ligand. A receptor mutant with an extra N-glycosylation site at the position N 58 showed normal dimerization but a reduction of the Ca^{2+} signal in the functional assay. In an other experimental approach to test the influence of the C-terminus of the sweet taste receptor, we prepared a truncated version of both receptors. In Co-IPs together with the wildtype we could show that the C-terminus had no influence on the dimerization. In the Ca^{2+} -assay these pairs showed a reduction because probably the G protein could not bind at the correct site.

In the second part of the work the interaction of the C-terminal domains of rTas1r1 and rTas1r2 with rFhl-2, a member of the four and a half LIM family was tested. Initially the interaction was checked in the yeast-two-hybrid system. It could be shown that the half and the first LIM domain are essential for the interaction with rTas1r1-ct, rTas1r2-ct and rTas1r3-ct and that the interaction between rFhl-2 and rTas1r1-ct was stronger. No interaction was detectable between rTas1r3 and rFhl-2. In the next step using RT-PCR the expression of rFhl-2 in sensory and other tissues was demonstrated. For further investigations a cell culture based system was used to verify these interaction. In heterologous cells the interaction with r Fhl-2 could nether be demonstrated for the tagged C-termini of rTas1r1, -2 and -3 nor for the entire receptor stably expressed in a cell line.

7 Literaturverzeichnis

- Abumrad N.A. (2005) CD36 may determine our desire for dietary fats. *Journal of Clinical Investigation* 115(11): 2965-2967.
- Adler E., Hoon M.A., Mueller K.L., Chandrashekar J., Ryba J.P. & Zuker C.S. (2000) A novel family of mammalian taste receptors. *Cell* 100: 693-702.
- Amrein H. & Bray S. (2003) Bitter-sweet solution in taste transduction. *Cell* 112(3): 283-4.
- Angers S., Salahpour A. & Bouvier M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annual review of pharmacology and toxicology* 42: 409-435.
- Bach I. (2000) The LIM domain: regulation by association. *Mechanisms of development* 91(1-2): 5-17.
- Bai M., Janicic N., Trivedi S., Quinn S.J., Cole D.E., Brown E.M. & Hendy G.N. (1997) Markedly reduced activity of mutant calcium-sensing receptor with an inserted Alu element from a kindred with familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Journal of Clinical Investigation*. 99(8): 1917-1925.
- Bai M., Quinn S., Trivedi S., Kifor O., Pearce, S., Pollak, M.R., Krapcho K., Hebert S.C. & Brown E.M. (1996) Expression and Characterization of Inactivating and Activating Mutations in the Human Ca^{2+} -sensing Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 271(32): 19537-19545.
- Bai M., Trivedi S. & Brown E.M. (1998) Dimerization of the Extracellular Calcium-sensing Receptor (CaR) on the Cell Surface of CaR-transfected HEK293 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273(36): 23605-23610.
- Behrens M., Bartelt J., Reichling C., Winnig M., Kuhn C. & Meyerhof W. (2006) Members of RTP and REEP Gene Families Influence Functional Bitter Taste Receptor Expression. *Journal of Biological Chemistry* 281(29): 20650-20659.
- Bessis A.S., Bertrand H.O., Galvez T., de Colle C., Pin J.P. & Acher F. (2002) Three-dimensional model of the extracellular domain of the type 4a metabotropic glutamate receptor: new insights into the activation process. *Protein science* 9: 2200-2209.
- Bockaert J. & Pin J.P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO* 18(7): 1723-1729.
- Bockaert J., Marin P., Dumuis A. & Fagni L. (2003) The "magic tail" of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Letters* 546: 65-72.
- Bouschet T., Martin S. & Henley J.M. (2005) Receptor-activity-modifying proteins are required for forward trafficking of the calcium-sensing receptor to the plasma membrane. *Journal of Cell Science* 118: 4709-4720.
- Bouvier M. (2001). Oligomerization Of G-Protein-Coupled Transmitter Receptors. *Nature reviews* 2: 274-286.

- Burhenne N. (2003) Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb der T1R-Familie der Umami- und Süß-Rezeptoren aus *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769). Dissertation.
- Caicedo A., Kim K.N. & Roper S.D (2002) Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *Journal of physiology* 544: 501-509.
- Canessa C.M. (1994) Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463-467.
- Chandrashekar J., Mueller K.L., Hoon M.A., Adler E., Feng L., Guo W. Zuker C.S., & Ryba J.P. (2000) T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell* 100: 703-711.
- Chapple J.P. & Cheetham M.E. (2003) The chaperone environment at the Cytoplasmic Face of the Endoplasmic Reticulum Can Modulate Rhodopsin Processing and Inclusion Formation. *Journal of Biological Chemistry* 278(21): 19087-19094.
- Chaudhari N., Landin A.M. & Roper S.D. (2000) A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neuroscience* 3: 113-119.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88: 9578-9582.
- Chu P. H., Bardwell W. M., Gu Y., Ross J. and Chen J. (2000) FHL2 (SLIM3) is not essential for cardiac development and function. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7460–7462
- Chu P. H., Ruiz-Lozano P., Zhou Q., Cai C. and Chen J. (2000) Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mechanisms of development* 95: 259-265.
- Couve A., Filipov A.K., Conolly C.N., Bettler B., Brown D.A. & Moss S.J. (1998) Intracellular Retention of Recombinant GABA_BReceptors. *Journal of Biological Chemistry* 273: 26361-26367.
- Damak S., Rong M., Yasumatsu K., Kokrashvili Z., Varadarajan V., Zou S., Jiang P., Ninomiya Y., Margolskee R.F. (2003) Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science* 301(5634): 850-853.
- Dawid I.G., Breen J.J. & Toyama R. (1998) LIM domains: multiple roles as adaptors and functional modifiers in protein interactions. *Trends in Genetic* 14(4): 156-162.
- Ding D.X., Vera J.C., Heaney M.L. & Golde D.W. (1995) N-glycosylation of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit is essential for ligand binding and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 270(41): 24580-24584.
- El Mourabit H., Muller S., Tunggal L., Paulsson M. & Aumailley M. (2004) Analysis of the adaptor function of the LIM domain-containing protein FHL2 using an affinity chromatography approach. *Journal of Cellular Biochemistry*. 92(3): 612-625.
- Ellgaard L. & Helenius A. (2003) Quality Control in the Endoplasmic Reticulum. *Nature Reviews* 4: 181-191.
- Ellgaard L., Molinari M. & Helenius A. (1999) Setting the Standards: Quality Control in the Secretory Pathway. *Science* 286: 1882-1888.

- Fan G.F., Ray K., Zhao X.M. Goldsmith P.K. & Spiegel A.M. (1998) Mutational Analysis of the cysteines in the extracellular domain of the human Ca²⁺ receptor: effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. *FEBS Letters* 6: 353-356.
- Fields S. & Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230): 245-246.
- Fields S. & Sternglanz R. (1994) The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetic* 10(8): 286-292.
- Fimia G.M., de Cesare D. & Sassone-Corsi P. (2000) A Family of LIM-Only Transcriptional Coactivators: Tissue-Specific Expression and Selective Activation of CREB and CREM. *Molecular and cellular biology* 20(22): 8613-8622.
- Fuller J.L. (1974) Single Locus control of saccharin preference in mice. *J. Hered.* 65: 33-36.
- Genini M., Schwalbe P., Scholl F.A., Remppis A., Mattei M.G. & Schafer B.W. (1997) Subtractive cloning and characterization of DRAL, a novel LIM-domain protein down-regulated in rhabdomyosarcoma DNA. *Cell Biology* 16(4): 433-42.
- Gietz R.D. & Woods R.A. (1994) High Efficiency transformation in Yeast. (Invited Book Chapter) In *Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches*, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press. 121-134.
- Gilberston T.A., Boughter J.D., Zhang H. & Smith D.V. (2001) Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: whole-cell responses to apical chemical stimulation. *Journal of Neuroscience* 21: 4931-4941.
- Gilbertson T.A. & Boughter J.D. (2003) Taste transduction: appetizing times in gustation. *Neuro Report* 14(7): 905-911.
- Gilbertson T.A., Boughter J.D., Zhang H. & Smith D.V. (1997) Distribution of Gustatory Sensitivities in Rat Taste Cells: Whole-Cell Responses to Apical Chemical Stimulation. *Journal of Neuroscience* 21: 4931-4941.
- Grünewald S., Schupp B.J., Ikeda S.R., Kuner R., Steigerwald F., Kornau H.-C. & Köhr G. (2002) Importance of the γ -Aminobutyric Acid_B Receptor C-termini for G-Protein Coupling. *Molecular Pharmacology* 61: 1070-1080.
- Haas I.G. & Wabl M. (1983). Immunoglobulin heavy chain binding protein. *Nature* 306(5941): 387-389.
- Hall R.A. & Lefkowitz R.J. (2002) Regulation of the G Protein-coupled Receptor Signalling by scaffolding Proteins. *Circulation Research* 91: 672-680.
- Hammond C., Braakman I. & Helenius A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(3): 913-917.
- Hammond, C. & Helenius A. (1994) Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *Journal of Cell Biology* 126(1): 41-52.
- Han G. & Hampson DR. (1999) Ligand Binding to the Amino-terminal Domain of the mGluR4 Subtype of the Metabotropic Glutamate Receptor. *Jornal of Biological Chemistry* 274: 10008-10013.

- Heck G.L., Mierson S. & deSimone J.A. (1984) Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science* 223: 403-405.
- Helenius A. & Aebi M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* 73: 1019-1049.
- Helenius A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* 5(3): 253-265.
- Hermans E. & Chaliss R.A.J. (2001) Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors. *Biochemical Journal*. 359: 465-484.
- Herness M.S. & Gilbertson T.A. (1999) Cellular mechanisms of taste transduction. *Annual Review of Physiology* 61: 873-900.
- Hoon M.A., Adler E., Lindemeier J., Battey J.F., Ryba N. & Zuker C.S. (1999) Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with Distinct Topographic Selectivity. *Cell* 96: 541-551.
- Hu J., Reyes-Cruz G., Goldsmith P.K. & Spiegel A.M. (2000) The Venus's-flytrap and Cystein-rich Domains of the Human Ca^{2+} Receptor Are Not Linked by Disulfide Bonds. *Journal of Biological Chemistry* 276(10): 6901-6904.
- Huang A.L., Chen X., Hoon M.A., Chandrashekar J., Guo W., Trankner D., Ryba N.J. & Zuker C.S. (2006) The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 442(7105): 934-938.
- Hurtley S.M. & Helenius A. (1989) Protein Oligomerization in the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Cell Biology* 5: 277-307
- Ishimaru Y., Inada H., Kubota M., Zhuang H., Tominaga M. & Matsunami H. (2006) Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103(33): 12569-12574.
- Jiang P., Cui M., Zhao B., Liu Z., Snyder L.A., Benard L.M., Osman R., Margolskee R.F. & Max M. (2005) Lactisol Interacts with the Transmembrane Domains of Human T1R3 to Inhibit Sweet Taste. *Journal of Biological Chemistry* 280(15): 15238-15246.
- Jiang P., Cui M., Zhao B., Snyder L.A., Benard L.M., Osman R., Max M. & Margolskee R.F. (2005) Identification of the Cyclamate Interaction Site within the Transmembrane Domain of the Human Sweet Taste Receptor Subunit T1R3. *Journal of Biological Chemistry* 280(40): 34296-34305.
- Jiang P., Ji Q., Liu Z., Snyder L.A., Benard L.M., Margolskee R.F. & Max M. (2004) The Cystein-rich Region of T1R3 Determines Responses to Intensely Sweet Proteins. *Journal of Biological Chemistry* 279(43): 45068-45075.
- Jiang Y.F., Zhang Z., Kifor O., Lane C.R., Quinn S.J. & Bai M. (2002) Protein kinase C (PKC) phosphorylation of the Ca^{2+} -sensing receptor (CaR) modulates functional interaction of G proteins with the CaR cytoplasmic tail. *Journal of Biological Chemistry*. 277(52): 50543-50549
- Johanneesen M., Moller S., Hansen T., Moens U. & vanGhelue M. (2006) The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL-2. *Cellular and molecular life sciences* 63. 268-284.

- Jones K.A., Borowsky B., Tamm J.A., Craig D.A., Durkin M.M., Dai M., Yao W.J., Johnson M., Gunwaldsen C., Huang L.Y., Tang C., Shen Q., Salon J.A., Morse K., Laz T., Smith K.E., Nagarathnam D., Noble S.A., Branchek T.A. & Gerald C. (1998) GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2. *Nature* 396(6712): 674-679.
- Jurata L.W. & Gill G.N. (1998) Structure and function of LIM domains. *Current topics in microbiology and immunology* 228: 75-113.
- Kadramas J.L. & Beckerle M.C. (2004) The LIM Domain: From The Cytoskeleton to the Nuclues. *Nature Reviews* 5: 920-931.
- Kammerer R.A., Frank S., Schulthess T., Landwehr R., Lustig A. & Engel J. (1999) Heterodimerization of a Funcional GABA_B Receptor is mediated by Parallel Coiled-Coil α -Helices. *Biochemistry* 38: 13263-13269.
- Katada S., Tanaka M. & Touhara K. (2004) Structural determinants for membrane trafficking and G-protein selectivity of a mouse olfactory receptor. *Journal of Neurochemistry* 90: 1453-1463.
- Kaupmann K., Malitschek B., Schuler V., Heid J., Froestl W., Beck P., Mosbacher J., Bischoff S., Kulik A., Shigemoto R., Karschin A. & Bettler B. (1998) GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* 396: 683-687.
- Kaushal S., Ridge K.D. & Khorana H.G. (2004) Structure and function in rhodopsin: the role of asparagine-linked glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(9):4024-8.
- Keenan R.M., Freymann D.M., Stroud R.M. & Walter P. (2001) The Signal Recognition Particle. *Annual Review of Biochemistry* 70: 755-775.
- Kempel I. (2004) Charakterisierung von ER-Signalsequenzen und Glykosylierung der heterolog exprimierten Süßgeschmacksrezeptoren T1R1, T1R2 und T1R3 der Ratte. Diplomarbeit
- Kinnamon S.C., Dionne V.E. & Beam K.G. (1988) Apical localization of K channels in taste cells provides the basis of sour taste transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85: 7023-7027.
- Kitagawa M., Kusakabe Y., Miura H., Ninomiya Y. & Hino A. (2001) Molecular Genetic Identification of a Candidate Receptor Gene for Sweet Taste. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 283: 236-242.
- Klinke R., Pape H.C. & Silbernagl S. (2005) Physiologie. 5.komplett überarbeitete Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Kong Y., Shelton J. M., Rothermel B., Li X., Richardson J. A., Bassel-Duby R. & Sanders W. (2001) Cardiac-specific LIM protein FHL2 modifies the hypertrophic response to beta-adrenergic stimulation. *Circulation* 103: 2731-2738.
- Kuang D., Yao Y., Lam J., Tsushima R.G., Hampson D.R. (2005) Cloning and characterization of a family C orphan G-protein coupled receptor. *Journal of Neurochemistry* 93(2): 383-391.
- Kuner R., Köhr G., Grünewald S., Eisenhardt G., Back A. & Kornau H.-C. (1999) Role of Heteromer Formation in GABA_B Receptor Function. *Science* 283: 74-77.

- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H. & Morikawa K. (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971-977.
- Kurihara K. & Kashiwayanagi M. (1998) Introductory remarks on umami taste. *Annals of the New York Academy of Sciences* 855: 393-397.
- Labalette C., Renard C.A., Neuveut C., Buendia M.A. & Wei Y. (2004) Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin. *Molecular and Cellular Biology* 24(24): 10689-10702.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lanctot P.M., Leclerc P.C., Clement M., Auger-Messier M., Escher E., Leduc R. & Guillemette G. (2005) Importance of N-Glycosylation positioning for cell-surface expression, targeting, affinity and quality control of the human AT₁ receptor. *Biochemical Journal* 390: 367-376.
- Lanctot P.M., Leclerc P.C., Escher E., Guillemette G. & Leduc R. (2005) Role of N-glycan-dependent quality control in the cell-surface expression of AT₁ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 395-402.
- Lanctot P.M., Leclerc P.C., Escher E., Leduc R. & Guillemette G. (1999) Role of N-Glycosylation in the Expression and Functional Properties of Human AT₁ Receptor. *Biochemistry* 38: 8621-8627.
- Laugerette F., Passilly-Degrace P., Patris B., Niot I., Febbraio M., Montmayeur J.P. & Besnard P. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *Journal of Clinical Investigation* (11): 3177-84.
- Lehrman M.A. (2001) Oligosaccharide-based Information in Endoplasmic Reticulum Quality Control and Other Biological Systems. *Journal of Biological Chemistry* 276(12): 8623-8626.
- Lewcock J.W. & Reed R.R., (2001) Sweet successess. *Neuron* 31: 515-517.
- Li X., Inoue M., Reed D.R., Huque T., Puchalski R.B., Tordorff M.G., Ninomiya Beauchamp G.K. & Bachamanov A.A. (2001) High-resolution genetic mapping of saccharin preference locus (Sac) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (Gpr70) to mouse distal Chromosome 4. *Mammalian Genome* 12: 13-16.
- Lindemann B. (1996) Taste reception. *Physiological reviews* 76(3): 718-66.
- Lindemann B. (2001) Receptors and transduction in taste. *Nature* 413: 219-225.
- Liu D. & Liman E.R. (2003) Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(25): 15160-15165.
- Lodish H, Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D. & Darnell J. (2000) *Molecular Cell Biology* (4ed.) New York: W.H. Freeman and Company
- LopezJimenez N.D., Cavenagh M.M., Sainz E., Cruz-Ithier M.A., Battey J.F. & Sullivan S.L. (2006) Two members of the TRPP family of ion channels, Pkd113 and Pkd211, are co-expressed in a subset of taste receptor cells. *Journal of Neurochemistry*. 98(1): 68-77.

- Lu M., Echeverri F. & Moyer B.D. (2003) Endoplasmic Reticulum Retention, Degradation, and Aggregation of Olfactory G-Protein Coupled Receptors. *Traffic* 4: 416-433.
- Lush I.E. (1989) The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin, acesulfam, dulcin and sucrose. *Genetical research* 53: 95-99.
- Lyall V., Alam R.I., Phan D.Q., Heck G.L. & deSimone J.A. (2002) Excitation and Adaptation in the Detection of Hydrogen Ions by Taste Receptor Cells: A Role for cAMP and Ca(2+). *Journal of Neurophysiology* 87: 399-408.
- Malitschek B., Schweizer C., Keir M., Heid J., Froestl W. & Mosbacher J. (1999). The N-terminal Domain of gamma-Aminobutyric Acid(B) receptors Is Sufficient to the Specify Agonist and Antagonist Binding. *Molecular pharmacology* 56: 448-454.
- Margeta-Mitrovic M., Jan Y.N. & Jan L.Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron*. 27(1):97-106.
- Margolskee R.F. (2001) Molecular Mechanisms of Bitter and Sweet Taste Transduction. *Journal of Biological Chemistry* 277(1): 1-4.
- Margolskee R.F. (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *Journal of Biological Chemical* 277(1): 1-4.
- Martin B., Schneider R., Janetzky S., Waibler Z., Pandur P., Kuhl M., Behrens J., von der Mark K., Starzinski-Powitz A. & Wixler V. (2002) The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *Journal of Cell Biology* 159: 113-122.
- Martoglio B. & Dobberstein B. (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends in Cell Biology* 8: 410-415.
- Maryuama Y., Pereira E., Margolskee R.F., Chaudhari N. & Roper S.D. (2006) Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor. *Journal of Neuroscience* 26(8): 2227-2234.
- Matsunami H., Montmayeur J.P. & Buck L.B. (2000) A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 404(6): 601-604.
- Max M., Shanker Y.G., Huang L., Rong M., Liu Z., Campagne F., Weinstein H., Damak S. & Margolskee R.F. (2001) *Tas1r3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac*. *Nature genetics* 28: 58-63.
- McLatchie L., Fraser N.J., Main M.J., Wise A., Brown J., Thompson N., Solari R., Lee M.G. & Foord S.M. (1998) RAMPS regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-339.
- Meacham G., Lu Z., King S., Sorscher E., Tousson A. & Cyr D.M. (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *EMBO* 18(6): 1492-1505.
- Minke B. & Cook B. (2002) TRP channel proteins and signal transduction. *Physiological reviews* 82: 429-472.
- Miyamoto T., Fujiyama R., Okada Y. & Sato T. (1998) Sour transduction involves activation of NPPB-sensitive conductance in mouse taste cells. *Journal of Neurophysiology* 80: 1852-1859.
- Miyamoto T., Fujiyama R., Okada Y. & Sato T. (2000) Acid and salt responses in mouse taste cells. *Progress in neurobiology* 62: 135-157.

- Miyoshi M.A., Abe K. & Emori Y. (2001) IP3 receptor type 3 and PLC β 2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells. *Chemical Senses*. 26(3): 259-265
- Montmayeur J.P., Liberles S.D., Matsunami H. & Buck L.B. (2001) A candidate taste receptor gene near a sweet taste locus. *Nature Neuroscience* 4: 492-498.
- Morrisson S.L. & Scharff M.D. (1975) Heavy chain-producing variants of a mouse myeloma cell line *Journal of Immunology* 114(2 Pt 1): 655-659.
- Müller J.M., Isele U., Metzger E., Rempel A., Moser M., Pscherer A., Breyer T., Holubarsch C., Buettner R. & Schule R. (2000) FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO Journal* 19(3): 359-69.
- Nelson G., Chandrashekar J., Hoon M.A., Feng L., Zhao G. & Ryba N. (2002) An Aminoacid-taste receptor. *Nature* 416: 199-202.
- Nelson G., Hoon M.A., Chandrashekar J., Zhang Y., Ryba N. & Zuker C.S. (2001) Mammalian Sweet Taste Receptor. *Cell* 106: 381-390.
- Njuki F., Nicholl C.G., Howard A., Mak J.C., Barnes P.J., Girgis S.I. & Legon S. (1993) A new calcitonin-receptor-like sequence in rat pulmonary blood vessels. *Clinical science* 85(4): 385-388.
- Nunez E. & Aragon C. (1994) Structural analysis and functional role of the carbohydrate component of glycine transporter. *Journal of Biological Chemistry* 269(24): 16920-16924.
- Okamoto T., Sekiyama N., Otsu M., Shimada Y., Sato A., Nakanishi S. & Jingami H. (1998) Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1. *Journal of Biological Chemistry* 273(21):13089-13096.
- Oliver J.D., Roderick H.L., Llewellyn D.H. & High, S. (1999) ERp57 Functions as a Subunit of Specific Complexes Formed with the ER Lectins Calreticulin and Calnexin. *Molecular Biology of the Cell* 10: 2573-2582.
- Oliver J.D., van der Wal F.J., Bulleid N.J. & High S. (1997) Interaction of the Thiol-Dependent Reductase ERp57 with nascent Glycoproteins. *Science* 275: 86-88.
- Ou W.J., Cameron P.H., Thomas D.Y. & Bergeron J.J. (1993) Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation. *Nature* 364(6440): 771-776.
- Pace A.J., Gama L. & Breitwieser G.E. (1999) Dimerization of the calcium-sensing receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys --> Ser mutations at Cys101 and Cys236. *Journal of Biological Chemistry* 274: 11629-11634
- Parmentier M.L., Prezeau L., Bockaert J. & Pin J.P. (2002) A model for the functioning of family 3 GPCRs. *Trends in pharmacological Sciences* 23: 268-274.
- Pawson T. & Nash P. (2003) Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science* 300: 445-452.
- Perez C.A., Huang L., Rong M., Kozak J.A., Preuss A.K. & Zhang . (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nature Neuroscience* 5: 1169-1176.

- Perez C.A., Margolskee R.F., Kinnamon S.C. & Ogura T. (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.
- Pin J.P., Galvez T. & Prezeau L. (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-Protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics* 98: 325-354.
- Plempner R.K. & Wolf D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends in biochemical sciences* 24(7): 266-270.
- Poussegur J. & Yamada K.M. (1978) Isolation and immunological characterization of a glucose-regulated fibroblast cell surface glycoprotein and its nonglycosylated precursor. *Cell* 13(1): 139-140.
- Prawitt D., Monteilh-Zoller M.K., Brixel L., Spangenberg C., Zabel B., Fleig A. & Penner R. (2003) TRPM5 is a transient Ca²⁺-activated cation channel responding to rapid changes in [Ca²⁺]_i. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(25): 15166-15171.
- Ray K, Hauschild B.C., Steinbach P.J., Goldsmith P.K., Hauache O., Spiegel A.M. (1999) Identification of the cysteine residues in the amino-terminal extracellular domain of the human Ca(2+) receptor critical for dimerization. Implications for function of monomeric Ca(2+) receptor. *Journal of Biological Chemistry* 274: 27642-27650.
- Ray K., Clapp P., Goldsmith P.K. & Spiegel A.M. (1998) Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 273(51): 34558-34567
- Ray K., Fan G.F., Goldsmith p.K. & Spiegel A.M. (1997) The Carboxyl Terminus of the Human Calcium Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 272(50): 31355-31361.
- Reed D.R., Bartoshuk L.M., Duffy V., Marino S. & Price R.A. (1995) Propylthiouracil tasting: determination of underlying threshold distributions using maximum likelihood. *Chemical Senses* 20: 529-33
- Rehm, H. (2002) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 4. Auflage Spektrum Akademischer Verlag.
- Rehner G. & Daniel H. (2002). *Biochemie der Ernährung* 2. Auflage Spektrum/Akademischer Verlag.
- Ritter & Helenius (2000) Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nature Structural Biology* 7(4): 278-280.
- Robbins M.J., Ciruela F., Rhodes A. & McIlhinney R.A. (1999) Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. *Journal of Neurochemistry* 72(6): 2539-2547.
- Romano C., Miller J.K., Hyrc K., Dikranian S., Mennerick S., Takeuchi Y., Goldberg M.P., O'Malley K.L. (2001) Covalent and noncovalent interactions mediate metabotropic glutamate receptor mGlu5 dimerization. *Molecular Pharmacology* 59(1): 46-53.

- Romano C., Yang W.L. & O'Malley K.L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. *Journal of Biological Chemistry* 271: 28612-28616.
- Roper S.D. (2003). Monosodium glutamate (MSG) and taste-mGluR4, a candidate for an umami taste receptor. *Forum of Nutrition* 56: 87-89.
- Ross E.M. & Wilkie T.M. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual Review Biochemistry*. 69: 795-827.
- Roth A., Kreienkamp H.-J., Nehring R.B., Roosterman D., Meyerhof W. & Richter D. (1997) Endocytosis of the rat somatostatin receptors: subtype discrimination, ligand specificity, and delineation of carboxy-terminal positive and negative sequence motifs. *DNA and Cell Biology* 16(1): 111-119.
- Sainz E., Korley J.N., Battey J.F. & Sullivan S.L. (2001) Identification of a novel member of the T1R family of putative taste receptors. *Journal of Neurochemistry* 77: 896-903.
- Saito H., Kubota M., Roberts R.W., Chi Q. & Matsunami H. (2004) RTP Family Members Induce Functional Expression of Mammalian Odorant Receptors. *Cell* 119: 679-691.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Samson T., Smyth N., Janetzky S., Wendler O., Müller J.M., Schüle R., Mark H., Mark K. & Wixler V. (2004) The LIM-only Proteins FHL2 and FHL3 Interact with α - and β -Subunits of the Muscle $\alpha_7\beta_1$ Integrin Receptor. *Journal of Biological Chemistry* 279(27): 28641-28652.
- San Gabriel A., Uneyama H., Yoshie S. & Torii K. (2005). Cloning and Characterization of a Novel mGluR1 Variant from Vallate Papillae that Functions as a Receptor for L-glutamate Stimuli. *Chemical Senses* 30 Suppl 1: i25-i26.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5467.
- Scholl F.A., McLoughlin P., Ehler E., de Giovanni C. & Schafer B.W. (2000) DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *Journal of Cell Biology* 151(3): 495-506.
- Schröder M. & Kaufman R.J. (2005) The Mammalian Unfolded Protein Response. *Annual Review of Biochemistry* 74: 739-789.
- Schwartz T. & Blobel G. (2003) Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor. *Cell* 112(6): 793-803.
- Selkirk J.V, Chaliss R.A., Rhodes A. & McIlhenney R.A. (2002) Characterization of an N-terminal secreted domain of the type-1 human metabotropic glutamate receptor produced by a mammalian cell line. *Journal of Neurochemistry* 80: 346-353.
- Spiro R.G. (1996) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds *Glycobiology* 12(4): 43R-56R.
- Stevens D.R., Seifert R., Bufe B., Müller F., Kremmer E., Gauss R., Meyerhof W., Kaupp U.B. & Lindemann B. (2001) The hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413: 631-635.

- Sun J., Yan G., Ren A., You B. & Liao J.K. (2006) FHL-2/SLIM3 Decreases Cardiomyocyte Survival by Inhibitory Interaction With Sphingosine Kinase-1. *Circulation Research* 99(5): 468-476.
- Tanahashi H. & Tabira T. (2000) Alzheimer's disease-associated presenilin 2 interacts with DRAL, an LIM-domain protein. *Human molecular genetics* 9(15): 2281-2289.
- Tsuji Y., Shimada Y., Takeshita T., Kajimura N., Nomura S., Sekiyama N., Otomo J., Usukura J., Nakanishi S. & Jingami H. (2000) Cryptic Dimer Interface and Domain Organization of the Extracellular region of Metabotropic Glutamate Receptor Subtype 1. *Journal of Biological Chemistry* 275: 28144-28151.
- Ueda T., Ugawa S., Yamamura H., Imaizumi Y. & Shimada S. (2003) Functional Interaction between T2R Taste Receptors and G-Protein α Subunits Expressed in Taste Receptor Cells. *Journal of Neuroscience* 23: 7376-7380.
- Ugawa S., Minami Y., Guo W., Saishin Y., Takatsuji K., Yamamoto T., Tohyama M. & Shimada S. (1998) Receptor that leaves a sour taste in the mouth. *Nature* 395: 555-556.
- Urig S., Gowher H., Hermann A. Beck C. Fateni M., Humeny A. & Jeltsch A. (2002) The Escherichia coli dam DNA methyltransferase modifies DNA in a highly processive reaction. *Journal of Molecular Biology* 21: 1085-1096.
- Vassilakos A., Michalak M., Lehrman M. & Williams D.B. (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 37(10): 3480-3490.
- Voet D. & Voet G.J. (2002) *Biochemistry* (3rd) Wiley John Wiley & Sons, Inc.
- Wang W. & Malcolm B.A. (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26: 680-682.
- Ware F.E., Vassilakos A., Peterson P.A., Jackson M.R., Lehrman M.A. & Williams D.B. (1995) The Molecular Chaperone Calnexin Binds Glc₁Man₉GlcNAc₂ Oligosaccharide as an Initial Step in Recognizing Unfolded Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry* 270(9): 4697-4704.
- Warren R.P. & Lewis R.C. (1970) Taste polymorphism in mice involving a bitter sugar derivative. *Nature* 227: 77-78.
- Wellendorph P. & Bräuner-Osborne (2004) Molecular cloning, expression, and sequence analysis of GPRC6A, a novel family C G-protein-coupled receptor. *Gene* 335: 37-46.
- Wellendorph P., Hansen K.B., Balsgaard A., Greenwood J.R., Egebjerg J. & Brauner-Osborne H. (2005) Deorphanization of GPRC6A: a promiscuous L-alpha-amino acid receptor with preference for basic amino acids. *Molecular Pharmacology* 67(3): 589-597.
- White, J.H., Wise, A., Main, M.J., Green, A., Fraser, N.J., Disney, G.H., Barnes, A.A., Emson, P., Foord, S.M. & Marshall, F.H. (1998) Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor. *Nature* 396, 679-682.
- Winnig M., Bufe B. & Meyerhof W. (2005) Valine 738 and lysine 735 in the fifth transmembrane domain of rTas1r3 mediate insensitivity towards lactisole of the rat sweet taste receptor. *BMC Neuroscience* 6(1): 22.

- Wixler V., Geerts D., Laplantine E., Westhoff D., Smyth N., Aumailley M., Sonnenberg A. & Paulsson M. (2000) The LIM-only Protein DRAL/FHL2 Binds to the Cytoplasmic Domain of several α and β Integrin Chains and Is Recruited to Adhesion Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 275(43): 33669-33678.
- Xu H., Staszewski L., Tang H., Adler E., Zoller M. & Li X. (2004) Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(39): 14258-146223.
- Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Mueller K.L., Cook B., Wu D., Zuker C.S. & Ryba N. (2003). Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. *Cell* 112: 293-301.
- Zhao G., Zhang H., Hoon M.A., Chandrashekar J., Erlenbach I. & Ryba N. (2003) The receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste. *Cell* 115: 255-266.

8 Anhang

8.1 Vorhersage der potentiellen N-Glykosylierungsstellen des Süßgeschmacksrezeptors

Zur Vorhersage der pot. N-Glykosylierungsstellen des rTas1r2 und rTas1r3 wurde das Computerprogramm NetNGlyc 1.0 verwendet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Als potentielle N-Glykosylierungsstellen werden von dem Programm Asparaginreste, der nachfolgenden Konsensus-Sequenz betrachtet: Asn-Xaa-Ser/Thr. Die AS-Sequenz wird von neun neuronalen Netzwerken analysiert und in der Spalte Jury-Agreement ist zusammengefasst wieviele dieser Netzwerke den Asparaginrest als potentielle N-Glykosylierungsstelle betrachtet.

SeqName	Position	Potential agreement	Jury result	N-Glyc
rTas1r2	87 NCSS	0.5891	(9/9)	++
rTas1r2	296 NFTG	0.7510	(9/9)	+++
rTas1r2	316 NLTE	0.6923	(8/9)	+
rTas1r2	355 NTTN	0.6332	(8/9)	+
rTas1r2	372 NTKK	0.7036	(9/9)	++
rTas1r2	432 NFTL	0.5802	(7/9)	+
rTas1r2	484 NVSW	0.5881	(7/9)	+
rTas1r2	491 NNTV	0.5400	(4/9)	+
rTas1r2	531 NRSA	0.5999	(7/9)	+

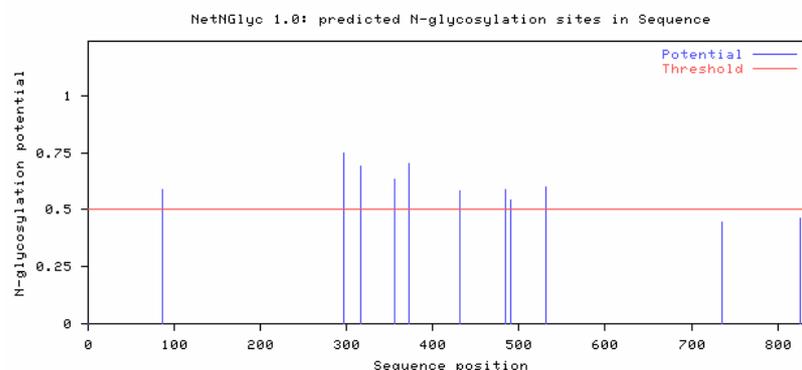


Abbildung 31: Potentielle N-Glykosylierungsstellen des rTas1r2

SeqName	Position	Potential agreement	Jury result	N-Glyc
rTas1r3	85 NGS	0.5913	(8/9)	+
rTas1r3	130 NYTQ	0.7676	(9/9)	+++
rTas1r3	203 NFSW	0.6652	(9/9)	++
rTas1r3	264 NQSK	0.6549	(9/9)	++
rTas1r3	379 NLSS	0.5824	(7/9)	+
rTas1r3	387 NLSA	0.5701	(7/9)	+
rTas1r3	418 NVSH	0.6172	(7/9)	+
rTas1r3	439 NMSF	0.4554	(8/9)	-
rTas1r3	482 NGTL	0.6613	(9/9)	++

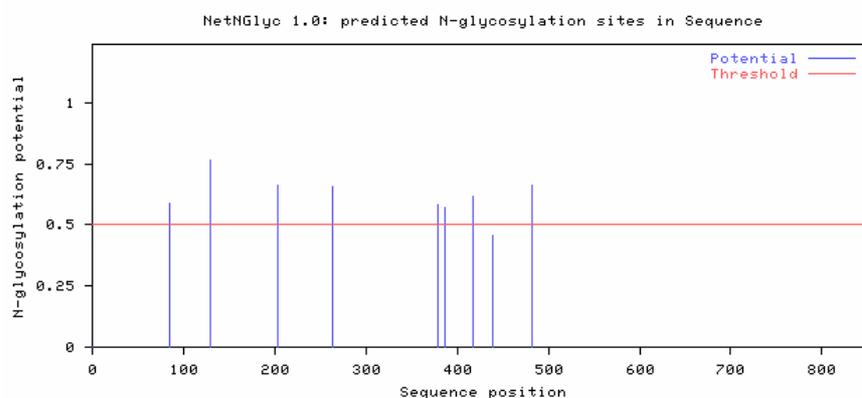


Abbildung 32: Potentielle N-Glykosylierungsstellen des rTas1r3

8.2 Sequenzen von rTas1r2 und rTas1r3

8.2.1 Sequenz von rTas1r2

```

1 ATGGG TCCCCAGGCA AGGACACTCT GCTTGCTGTC
  M G P Q A R T L C L L S
51 TCTCCTGCTG CATGTTCTGC CTAAGCCAGG CAAGCTGGTA GAGAACTCTG
  L L L H V L P K P G K L V E N S D
101 ACTTCCACCT GGCCGGGGAC TACCTCCTGG GTGGCCTCTT TACCCTCCAT
  F H L A G D Y L L G G L F T L H
151 GCCAACGTGA AGAGCATCTC CCACCTCAGC TACCTGCAGG TGCCCAAGTG
  A N V K S I S H L S Y L Q V P K C
201 CAATGAGTTC ACCATGAAGG TGTTGGGCTA CAACCTCATG CAGGCCATGC
  N E F T M K V L G Y N L M Q A M R
251 GTTTCGCTGT GGAGGAGATC AACAACTGTA GCTCCCTGCT ACCCGCGTG
  F A V E E I N N C S S L L P G V
301 CTGCTCGGCT ACGAGATGGT GGATGTCTGT TACCTCTCCA ACAATATCCA
  L L G Y E M V D V C Y L S N N I H
351 CCCTGGGCTC TACTTCCTGG CACAGGACGA CGACCTCTCG CCCATCCTCA
  P G L Y F L A Q D D D L L P I L K
401 AAGACTACAG CCAGTACATG CCCCACGTGG TGGCTGTCAT TGGCCCCGAC
  D Y S Q Y M P H V V A V I G P D
451 AACTCTGAGT CCGCCATTAC CGTGTCCAAC ATTCTCTCTC ATTTCTCAT
  N S E S A I T V S N I L S H F L I
501 CCCACAGATC ACATACAGCG CCATCTCCGA CAAGCTGCGG GACAAGCGGC
  P Q I T Y S A I S D K L R D K R H
551 ACTTCCCTAG CATGCTACGC ACAGTGCCCA GCGCCACCCA CCACATCGAG
  F P S M L R T V P S A T H H I E
601 GCCATGGTGC AGCTGATGGT TCACTTCCAA TGGAAGTGGG TTGTGGTGTCT
  A M V Q L M V H F Q W N W I V V L
651 GGTGAGCGAC GACGATTACG GCCGCGAGAA CAGCCACCTG TTGAGCCAGC
  V S D D D Y G R E N S H L L S Q R
701 GTCTGACCAA AACGAGCGAC ATCTGCATTG CCTTCCAGGA GGTTCGCCCC
  L T K T S D I C I A F Q E V L P
751 ATACCTGAGT CCAGCCAGGT CATGAGGTCC GAGGAGCAGA GACAACTGGA
  I P E S S Q V M R S E E Q R Q L D
801 CAACATCCTG GACAAGCTGC GGCGGACCTC GGCGCGCGTC GTGGTGGTGT
  N I L D K L R R T S A R V V V V F
851 TCTCGCCCGA GCTGAGCCTG TATAGCTTCT TTCACGAGGT GCTCCGCTGG
  S P E L S L Y S F F H E V L R W
901 AACTTCACGG GTTTTGTGTG GATCGCCTCT GAGTCCTGGG CTATCGACCC
  N F T G F V W I A S E S W A I D P
951 AGTTCTGCAT AACCTCACGG AGCTGCGCCA CACGGGTACT TTTCTGGGGC
  V L H N L T E L R H T G T F L G V
1001 TCACCATCCA GAGGGTGTCC ATCCCTGGCT TCAGTCAGTT CCGAGTGCGC
  T I Q R V S I P G F S Q F R V R
1051 CGTGACAAGC CAGGGTATCC CGTGCCTAAC ACGACCAACC TGCGGACGAC
  R D K P G Y P V P N T T N L R T T
1101 CTGCAACCAG GACTGTGACG CCTGCTTGAA CACCACCAAG TCCTTCAACA
  C N Q D C D A C L N T T K S F N N
1151 ACATCCTTAT ACTTTCGGGG GAGCGCGTGG TCTACAGCGT GTACTCGGCA
  I L I L S G E R V V Y S V Y S A
1201 GTTTACGCGG TGGCCCATGC CCTCCACAGA CTCCTCGGCT GTAACCGGGT
  V Y A V A H A L H R L L G C N R V
1251 CCGCTGCACC AAGCAAAAGG TCTACCCGTG GCAGTACTC AGGGAGATCT
  R C T K Q K V Y P W Q L L R E I W
1301 GGCACGTCAA CTTACAGCTC CTGGGTAACC GGCTCTTCTT TGACCAACAA
  H V N F T L L G N R L F F D Q Q

```

```

1351 GGGGACATGC CGATGCTCTT GGACATCATC CAGTGGCAGT GGGACCTGAG
      G D M P M L L D I I Q W Q W D L S
1401 CCAGAATCCC TTCCAAAGCA TCGCCTCCTA TTCTCCCACC AGCAAGAGGC
      Q N P F Q S I A S Y S P T S K R L
1451 TAACCTACAT TAACAATGTG TCCTGGTACA CCCCCAACAA CACGGTCCCT
      T Y I N N V S W Y T P N N T V P
1501 GTCTCCATGT GTTCCAAGAG CTGCCAGCCA GGGCAAATGA AAAAGTCTGT
      V S M C S K S C Q P G Q M K K S V
1551 GGGCCTCCAC CCTTGTTGCT TCGAGTGCTT GGATTGTATG CCAGGCACCT
      G L H P C C F E C L D C M P G T Y
1601 ACCTCAACCG CTCAGCAGAT GAGTTTAACT GTCTGTCCTG CCCGGGTTCC
      L N R S A D E F N C L S C P G S
1651 ATGTGGTCCT ACAAGAACGA CATCACTTGC TTCCAGCGGC GGCCTACCTT
      M W S Y K N D I T C F Q R R P T F
1701 CCTGGAGTGG CACGAAGTGC CCACCATCGT GGTGGCCATA CTGGCTGCCC
      L E W H E V P T I V V A I L A A L
1751 TGGGCTTCTT CAGTACACTG GCCATTCTTT TCATCTTCTG GAGACATTTT
      G F F S T L A I L F I F W R H F
1801 CAGACACCCA TGGTGCGCTC GGCCGGTGGC CCCATGTGCT TCCTGATGCT
      Q T P M V R S A G G P M C F L M L
1851 CGTGCCCCCTG CTGCTGGCGT TTGGGATGGT GCCCGTGTAT GTGGGGCCCC
      V P L L L A F G M V P V Y V G P P
1901 CCACGGTCTT CTCATGCTTC TGCCGACAGG CTTTCTTCAC CGTCTGCTTC
      T V F S C F C R Q A F F T V C F
1951 TCCATCTGCC TATCTGCAT CACCGTGCGC TCCTTCCAGA TCGTGTGTGT
      S I C L S C I T V R S F Q I V C V
2001 CTTCAAGATG GCCAGACGCC TGCCAAGTGC CTACAGTTTT TGGATGCGTT
      F K M A R R L P S A Y S F W M R Y
2051 ACCACGGGCC CTATGTCTTC GTGGCCTTCA TCACGGCCAT CAAGGTGGCC
      H G P Y V F V A F I T A I K V A
2101 CTGGTGGTGG GCAACATGCT GGCCACCACC ATCAACCCCA TTGGCCGGAC
      L V V G N M L A T T I N P I G R T
2151 CGACCCGGAT GACCCCAACA TCATGATCCT CTCGTGCCAC CCTAACTACC
      D P D D P N I M I L S C H P N Y R
2201 GCAACGGGCT ACTGTTCAAC ACCAGCATGG ACTTGCTGCT GTCTGTGCTG
      N G L L F N T S M D L L L S V L
2251 GGTTTCAGCT TCGCTTACAT GGGCAAGGAG CTGCCCACCA ACTACAACGA
      G F S F A Y M G K E L P T N Y N E
2301 AGCCAAGTTC ATCACTCTCA GCATGACCTT CTCCTTCACC TCCTCCATCT
      A K F I T L S M T F S F T S S I S
2351 CCCTCTGCAC CTTTATGTCT GTGCACGACG GCGTGCTGGT CACCATCATG
      L C T F M S V H D G V L V T I M
2401 GACCTCCTGG TCACTGTGCT CAACTTCCTG GCCATCGGQT TGGATACTT
      D L L V T V L N F L A I G L G Y F
2451 TGGCCCCAAG TGTTACATGA TCCTTTTCTA CCCGGAGCGC AACACCTCAG
      G P K C Y M I L F Y P E R N T S A
2501 CCTATTTCAA TAGCATGATC CAGGGCTACA CCATGAGGAA GAG
      Y F N S M I Q G Y T M R K S

```

Abbildung 33: cDNA von rTas1r2

Es ist die Nucleotidsequenz und Proteinsequenz des rTas1r2 dargestellt. Startcodon: rot, Cysteine: gelb, Transmembrandomänen sind schwarz unterstrichen, cysteinreiche Domäne ist rot unterstrichen und die potentiellen N-Glykosylierungstellen sind blau dargestellt.

8.2.2 Sequenz von rTas1r3

```

1  ATGCCGGGTT TGGCTATCTT GGGCCTCAGT CTGGCTGCTT TCCTGGAGCT
   M P G L A I L G L S L A A F L E L
51  TGGGATGGGG TCCTCTTTGT GTCTGTCACA GCAATTCAAG GCACAAGGGG
   G M G S S L C L S Q Q F K A Q G D
101 ACTATATATT GGGTGGACTA TTTCCCCTGG GCACAACCTGA GGAGGCCACT
   Y I L G G L F P L G T T E E A T
151 CTCAACCAGA GAACACAGCC CAACGGCATC CTATGTACCA GGTTCTCGCC
   L N Q R T Q P N G I L C T R F S P
201 CCTTGGTTTG TTCCTGGCCA TGGCTATGAA GATGGCTGTA GAGGAGATCA
   L G L F L A M A M K M A V E E I N
251 ACAATGGATC TGCCTTGCTC CCTGGGCTGC GACTGGGCTA TGACCTGTTT
   N G S A L L P G L R L G Y D L F
301 GACACATGCT CAGAGCCAGT GGTCACCATG AAGCCCAGCC TCATGTTTCAT
   D T C S E P V V T M K P S L M F M
351 GGCCAAGGTG GGAAGTCAAA GCATTGCTGC CTACTGCAAC TACACACAGT
   A K V G S Q S I A A Y C N Y T Q Y
401 ACCAACCCCG TGTGCTGGCT GTCATTGGTC CCCACTCATC AGAGCTTGCC
   Q P R V L A V I G P H S S E L A
451 CTCATTACAG GCAAGTTCTT CAGCTTCTTC CTCATGCCAC AGGTCAGCTA
   L I T G K F F S F F L M P Q V S Y
501 TAGTGCCAGC ATGGATCGGC TAAGTGACCG GGAAACATTT CCATCCTTCT
   S A S M D R L S D R E T F P S F F
551 TCCGCACAGT GCCCAGTGAC CGGGTGCAGC TGCAGGCCGT TGTGACACTG
   R T V P S D R V Q L Q A V V T L
601 TTGCAGAATT TCAGCTGGAA CTGGGTGGCT GCCTTAGGTA GTGATGATGA
   L Q N F S W N W V A A L G S D D D
651 CTATGGCCGG GAAGGTCTGA GCATCTTTTC TGGTCTGGCC AACTCACGAG
   Y G R E G L S I F S G L A N S R G
701 GTATCTGCAT TGCACACGAG GGCCTGGTGC CACAACATGA CACTAGTGGC
   I C I A H E G L V P Q H D T S G
751 CAACAATTGG GCAAGGTGGT GGATGTGCTA CGCCAAGTGA ACCAAAGCAA
   Q Q L G K V V D V L R Q V N Q S K
801 AGTACAGGTG GTGGTGCTGT TTGCATCTGC CCGTGCTGTC TACTCCCTTT
   V Q V V V L F A S A R A V Y S L F
851 TTAGCTACAG CATCCTTCAT GACCTCTCAC CCAAGGTATG GGTGGCCAGT
   S Y S I L H D L S P K V W V A S
901 GAGTCCTGGC TGACCTCTGA CCTGGTCATG ACACTTCCCA ATATTGCCCC
   E S W L T S D L V M T L P N I A R
951 TGTGGGCACT GTTCTTGGGT TTCTGCAGCG CGGTGCCCTA CTGCCTGAAT
   V G T V L G F L Q R G A L L P E F
1001 TTTCCCATTA TGTGGAGACT CGCCTTGCCC TAGCTGCTGA CCCAACATTC
   S H Y V E T R L A L A A D P T F
1051 TGTGCCTCCC TGAAAGCTGA GTTGGATCTG GAGGAGCGCG TGATGGGGCC
   C A S L K A E L D L E E R V M G P
1101 ACGCTGTTCA CAATGTGACT ACATCATGCT ACAGAACCTG TCATCTGGGC
   R C S Q C D Y I M L Q N L S S G L
1151 TGATGCAGAA CCTATCAGCT GGGCAGTTGC ACCACCAAAT ATTTGCAACC
   M Q N L S A G Q L H H Q I F A T
1201 TATGCAGCTG TGTACAGTGT GGCTCAGGCC CTTACAACA CCCTGCAGTG
   Y A A V Y S V A Q A L H N T L Q C
1251 CAATGTCTCA CATTGCCACA CATCAGAGCC TGTTCAACCC TGGCAGCTCC
   N V S H C H T S E P V Q P W Q L L
1301 TGGAGAACAT GTACAATATG AGTTTCCGTG CTCGAGACTT GACTGTCAG
   E N M Y N M S F R A R D L T L Q
1351 TTTGATGCCA AAGGGAGTGT AGACATGGAA TATGACCTGA AGATGTGGGT
   F D A K G S V D M E Y D L K M W V

```

```

1401 GTGGCAGAGC CCTACACCTG TACTACATAC TGTAGGCACC TTCAACGGCA
      W Q S P T P V L H T V G T F N G T
1451 CCCTTCAGCT GCAGCACTCG AAAATGTATT GGCCAGGCAA CCAGGTGCCA
      L Q L Q H S K M Y W P G N Q V P
1501 GTCTCCCAGT GCTCCCAGCA GTGCAAAGAT GGCCAGGTGC GCAGAGTAAA
      V S Q C S R Q C K D G Q V R R V K
1551 GGGCTTTTCAT TCCTGCTGCT ATGACTGTGT GGACTGCAAG GCAGGGAGCT
      G F H S C C Y D C V D C K A G S Y
1601 ACCGGAAGCA TCCAGATGAC TTCACCTGTA CTCCATGTGG CAAGGATCAG
      R K H P D D F T C T P C G K D Q
1651 TGGTCCCCAG AAAAAAGCAC AACCTGCTTA CCTCGCAGGC CCAAGTTTCT
      W S P E K S T T C L P R R P K F L
1701 GGCTTGGGGG GAGCCAGCTG TGCTGTCACT TCTCCTGCTG CTTTGCCTGG
      A W G E P A V L S L L L L L C L V
1751 TGCTGGGCCT GACACTGGCT GCCCTGGGGC TCTTTGTCCA CTACTGGGAC
      L G L T L A A L G L F V H Y W D
1801 AGCCCTCTTG TTCAGGCCTC AGGTGGGTCA CTGTTCTGCT TTGGCCTGAT
      S P L V Q A S G G S L F C F G L I
1851 CTGCCTAGGC CTCTTCTGCC TCAGTGTCTT TCTGTTCCCA GGACGACCAC
      C L G L F C L S V L L F P G R P R
1901 GCTCTGCCAG CTGCCTTGCC CAACAACCAA TGGCTCACCT CCCTCTCACA
      S A S C L A Q Q P M A H L P L T
1951 GGCTGCCTGA GCACACTCTT CCTGCAAGCA GCCGAGATCT TTGTGGAGTC
      G C L S T L F L Q A A E I F V E S
2001 TGAGCTGCCA CTGAGTTGGG CAAACTGGCT CTGCAGCTAC CTTCCGGGCC
      E L P L S W A N W L C S Y L R G P
2051 CCTGGGCTTG GCTGGTGGTA CTGCTGGCCA CTCTTGTGGA GGCTGCACTA
      W A W L V V L L A T L V E A A L
2101 TGTGCCTGGT ACTTGATGGC TTTCCCTCCA GAGGTGGTGA CAGATTGGCA
      C A W Y L M A F P P E V V T D W Q
2151 GGTGCTGCCC ACGGAGGTAC TGGAACACTG CCGCATGCGT TCCTGGGTCA
      V L P T E V L E H C R M R S W V S
2201 GCCTGGGCTT GGTGCACATC ACCAATGCAG TGTTAGCTTT CCTCTGCTTT
      L G L V H I T N A V L A F L C F
2251 CTGGGCACTT TCCTGGTACA GAGCCAGCCT GGTGCTATA ACCGTGCCCC
      L G T F L V Q S Q P G R Y N R A R
2301 TGGCCTCACC TTCGCCATGC TAGCTTATTT CATCATCTGG GTCTCTTTTG
      G L T F A M L A Y F I I W V S F V
2351 TGCCCCCTCT GGCTAATGTG CAGGTGGCCT ACCAGCCAGC TGTGCAGATG
      P L L A N V Q V A Y Q P A V Q M
2401 GGTGCTATCT TATTCTGTGC CCTGGGCATC CTGGCCACCT TCCACCTGCC
      G A I L F C A L G I L A T F H L P
2451 CAAATGCTAT GTACTTCTGT GGCTGCCAGA GCTCAACACC CAGGAGTTCT
      K C Y V L L W L P E L N T Q E F F
2501 TCCTGGGAAG GAGCCCCAAG GAAGCATCAG ATGGGAATAG TGGTAGTAGT
      L G R S P K E A S D G N S G S S
2551 GAGGCAACTC GGGGACACAG TGAATGA
      E A T R G H S E *

```

Abbildung 34: cDNA Sequenz- und Proteinsequenz von rTas1r3

Es ist die Nucleotidsequenz und Proteinsequenz des rTas1r3 dargestellt. Start- und Stopcodon: rot, Cysteine: gelb, Transmembrandomänen sind schwarz unterstrichen, cysteinreiche Domäne ist rot unterstrichen, potentielle N-Glykosylierungsstellen sind blau, eine zusätzlich eingeführte N-Glykosylierungsstelle ist türkis und die vorhergesagte Signalsequenz ist grün dargestellt.

8.3 Sequenz von rFhl-2

```

1  ATGACTGAAC GCTTTGACTG CCACCACTGC AATGAGTCTC TCTATGGCAA
   M T E R F D C H H C N E S L Y G K
51  GAAGTACATT CTAAAGGAGG AGAACCCGCA CTGTGTGGCC TGCTTCGAGG
   K Y I L K E E N P H C V A C F E E
101 AGCTCTATGC CAACACCTGT GAGGAGTGTG GAACACCCAT CGGCTGTGAC
   L Y A N T C E E C G T P I G C D
151 TGCAAGGACT TGTCTACAA GGATCGCCAC TGGCATGAAG GCTGCTTCCA
   C K D L S Y K D R H W H E G C F H
201 CTGCTCCCGG TGCGGGAGCT CGCTGGTGGA CAAGCCCTTT GCGGCCAAGG
   C S R C G S S L V D K P F A A K E
251 AGGAGCAGCT GCTGTGCACC GACTGCTATT CCAACGAGTA CTCGTCCAAG
   E Q L L C T D C Y S N E Y S S K
301 TGCCAGGAGT GTAAGAAGAC CATCATGCCA GGTACCCGCA AGATGGAATA
   C Q E C K K T I M P G T R K M E Y
351 CAAGGCACG AGCTGGCACG AGACCTGCTT CACCTGTCAG CGTGCCAGC
   K G S S W H E T C F T C Q R C Q Q
401 AGCCCATCGG AACCAAGAGC TTCATACCTA AGGAGAATCA GAACTTCTGC
   P I G T K S F I P K E N Q N F C
451 GTGCCCTGCT ATGAGAAGCA GTATGCCCTG CAGTGTGTGC AGTGCAAAAA
   V P C Y E K Q Y A L Q C V Q C K K
501 GCCAATTACC ACAGGAGGTG TTAATTACCG GGATCAGCCC TGGCACAGGG
   P I T T G G V T Y R D Q P W H R E
551 AGTGCTTTGT GTGCACAGCC TGCAAGAAGC AGCTATCTGG GCAACGCTTC
   C F V C T A C K K Q L S G Q R F
601 ACAGCCCGGG ATGAGTTTCC ATACTGCCTG ACCTGCTTCT GTGACCTGTA
   T A R D E F P Y C L T C F C D L Y
651 TGCTAAGAAG TGTGCTGGGT GCACCAACCC CATCAGTGGT CTGGGTGGCA
   A K K C A G C T N P I S G L G G T
701 CAAAGTACAT CTCTTTTGAG GAACGCCAGT GGCACAACGA CTGCTTTAAC
   K Y I S F E E R Q W H N D C F N
751 TGTAAGAAGT GCTCCCTGTC CTTGGTGGGG CGAGGCTTCC TCACAGAGAG
   C K K C S L S L V G R G F L T E R
801 AGACGACATC CTCTGTCCTG ACTGTGGAAA GGACATCTGA
   D D I L C P D C G K D I *

```

Abbildung 35: cDNA-Sequenz des Ratten FHI-2.

Es ist die Nucleotidsequenz des Ratten Fhl-2 dargestellt. Start- und Stopcodon: rot. Die LIM-Domänen türkis unterlegt.

8.4 Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin Arg R	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin Glycin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

8.5 Gefahrstoffverzeichnis

Substanz	Kennzeichnung Gefahrensymbole	Gefahrenhinweise R-Sätze	Sicherheitsratschläge S-Sätze
Acrylamid	T	45-46-E24/25- E48/23/24/25	53-45
Ammoniumpersulfat	O, Xn	8-22-36/37/38- 42/43	22-24-26-37
Ampicillin	Xn	36/37/38-42/43	22-26-36/37
DMSO (Dimethyl- sulfoxid)	Xi	20/22/36-38	23-26/36
Ethanol	F	11	7-16
Ethidiumbromid	T+	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Geneticin G418	T	61	53-36/37/39-45
Hygromycin	T	25-36/38	26-37-45
Igepal CA 630	Xn	22-41	26-39
Kanamycin	T	32/61	22/45/53
Leupeptin	Xn	20/22	28.1
Methanol	F, T	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
PMSF (Phenylmethyl- sulfonylfluorid)	T	23/24/25-34-40	26-36/37/39-45
2-Propanol	F, Xi	11-41-67	7-16-24-26-39
TEMED (Tetramethyl- ethylendiamin)	C, F	11-20/22-34	16-26-36/37/39-45
Triton X-100	Xn	22-41	24-26-39

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau des Geschmacksepithels der Ratte.	2
Abbildung 2: Struktureller Aufbau der Geschmacksrezeptoren.	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Signalweges des Süßgeschmacks (gemeinsamer Signalweg, der auch für bitter und umami postuliert wird).	10
Abbildung 4: Zwei Hypothesen der Geschmacksweiterleitung.	12
Abbildung 5: Aufbau Asparagin-verknüpfter Oligosaccharide und ihre Prozessierung	15
Abbildung 6: Topologie der LIM-Domäne.	20
Abbildung 7: Größenvergleich des rTas1r3 Wildtyps und ausgewählter rTas1r3-Mutanten.	55
Abbildung 8: Behandlung von rekombinant überexprimiertem rTas1r3-3xFLAG Wildtyp und seinen Mutanten mit den beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F.	57
Abbildung 9: Behandlung von rekombinant überexprimiertem rTas1r2-HSV Wildtyp und seinen Mutanten mit den beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F.	59
Abbildung 10: Behandlung von rekombinant überexprimierten rTrx/rGprc6a mit den beiden Endoglykosidasen Endo H und PNGase F.	60
Abbildung 11: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r2-HSV Wildtyp und seinen Mutanten mit rTas1r3-3xFLAG Wildtyp.	63
Abbildung 12: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r3-3xFLAG Wildtyp und seinen Mutanten mit rTas1r2-HSV Wildtyp.	66
Abbildung 13: Kontroll-Experimente zur Überprüfung der Spezifität der durchgeführten Ko-Immunpräzipitationen	68
Abbildung 14: Endoglykosidasen-Behandlung rTas1r3 ₊₅₈ -3xFLAG und Ko-Immunpräzipitation von rTas1r3 ₊₅₈ -3xFLAG mit rTas1r2WT-HSV.	69
Abbildung 15: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r2 _{WT} -HSV Wildtyp mit rTas1r3 Δ C-3xFLAG (A) bzw. rTas1r2 Δ C-HSV mit rTas1r3 _{WT} -3xFLAG Wildtyp (B), um den Einfluss des C-Terminus auf die Dimerisierung des Süßgeschmacksrezeptors zu zeigen.	72
Abbildung 16: Zelluläre Lokalisierung von rekombinant exprimiertem rTas1r2-HSV und rTas1r3-3xFLAG in HEK293-Zellen mit dem ER-Marker Calnexin und dem <i>cis</i> -Golgi-Marker GM130.	74
Abbildung 17: Ko-Lokalisation von rTas1r2 Δ C-HSV und rTas1r3 Δ C-3xFLAG in HEK293-Zellen mit dem ER-Marker Calnexin und dem <i>cis</i> -Golgi-Marker GM-130.	76
Abbildung 18: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r2-FLAG und rTas1r3-HSV mit verschiedenen Marker-Proteinen.	78
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Signalweges von rTas1r2 und rTas1r3 nach Liganden vermittelter Aktivierung im heterologen Expressionssystem.	80

Abbildung 20: Ergebnis der FLIPR-Messungen nach Transfektion von rTas1r2 _{WT} und rTas1r2-Mutanten mit dem rTas1r3 _{WT} -Rezeptor.	82
Abbildung 21: Ergebnis der FLIPR-Messungen nach Transfektion von rTas1r2 _{WT} mit rTas1r3 _{WT} und rTas1r3-Mutanten.	83
Abbildung 22: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von rFhl-2.	86
Abbildung 23: Bestimmung der relativen β -Galaktosidase-Aktivität von rFhl-2, rLim 1/2 -3, rLim 3-4 und mFhl-1 mit den Mitgliedern der rTas1r-Familie.	88
Abbildung 24: Expression von rFhl-2 in sensorischen und nicht-sensorischen Geweben.	89
Abbildung 25: Ko-Immunpräzipitation (Ko-IP) von rFhl-2-myc mit EGFP-rTas1R1-ct, EGFP-rTas1r2-ct und EGFP-rTas1r3-ct aus HEK293 Zellextrakt.	91
Abbildung 26: Ko-Immunpräzipitation von rTas1r2-Flag, rTas1r3-HSV und EGFP-rFhl-2 bzw. verschiedenen Deletionskonstrukten von rFhl-2 aus HEK293-Zellextrakt.	93
Abbildung 27: Zelluläre Lokalisierung von rTas1r2-FLAG und EGFP-rFhl-2 und seinen Deletionsmutanten in HEK293-Zellen.	95
Abbildung 28: Zelluläre Lokalisierung von rTas1r3-HSV und EGFP-rFhl-2 und seinen Deletionsmutanten in HEK293-Zellen.	97
Abbildung 29: Sequenzvergleich der cysteinreichen Region von rTas1r2, rTas1r3, rmGluR1, rGABA _B R1, rGABA _B R2 und des hCaSR.	105
Abbildung 30: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad innerhalb der FHL-Familie.	115
Abbildung 31: Potentielle N-Glykosylierungsstellen des rTas1r2	137
Abbildung 32: Potentielle N-Glykosylierungsstellen des rTas1r3	138
Abbildung 33: cDNA von rTas1r2	140
Abbildung 34: cDNA Sequenz- und Proteinsequenz von rTas1r3	142
Abbildung 35: cDNA-Sequenz des Ratten FHL-2.	143

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. Schmale danke ich für die Überlassung des Themas und für die Ideen und Diskussionen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. U. Hahn danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit am Fachbereich Chemie.

Marcel Winnig und Bernd Bufe danke ich für die Ermöglichung und tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der FLIPR-Experimente in Potsdam und für die Bereitstellung der stabilen Zell-Linie Z41 (rTas1r2/rTas1r3).

Allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Schmale, insbesondere J.-K. Hennigs, Heidje Christiansen, Eva-Maria Stübe und Anette Rosche danke ich für die schöne und produktive Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie insbesondere Agata Wewer, Sönke Harder und Hatmone Miroci und bei den Mitgliedern des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie II (Molekulare Zellbiologie) für die freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre im Labor bedanken.

Außerhalb der Wissenschaft geht ein sehr großer Dank an meine Familie ohne deren Zuspruch und Unterstützung dieses nicht möglich gewesen wäre.