Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb der T1R-Familie der Umami- und Süß-Rezeptoren aus *Rattus norvegicus* (BERKENHOUT, 1769)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie der
Universität Hamburg

vorgelegt von

Nicole Burhenne

aus
Witzenhausen

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHMALE
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H: BRETTING

Tag der Disputation: 11. Juli 2003

Hamburg, den 25. Juni 2003

Universität Hamburg
14/1
Fachbereich Biologie

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Das gustatorische System 1
1.2 Molekularbiologische Grundlagen des Bitter-, Umami- und Süß-Geschmacks 3
1.3 Dimerisierung 5
1.4 Signalwege und Codierung des Süß-Geschmacks 6
1.5 Funktionelle Rolle GPCR-interagierender Proteine 9

2 MATERIAL und METHODEN 14

2.1 Oligonukleotide, GenBank-Zugriffsnummern und Plasmidkonstrukte 14
2.1.1 Oligonukleotide 14
2.1.2 Nukleotidsequenzen und GenBank-Zugriffsnumern 17
2.1.3 Zur Verfügung gestellte Plasmide 17
2.1.4 Konstruierte Plasmide 18
2.2 Antikörper/ Protein-A-Agarose 20
2.3 Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien und Tiere 21
2.4 DNA: Molekularbiologische Methoden 22
2.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen 22
2.4.2 DNA-Gelelektrophorese 22
2.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten 22
2.4.4 DNA-Extraktion nach präparativer Agarosegelelektrophorese 22
2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten 22
2.4.6 Transformation von Bakterien 23
2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen 23
2.4.8 Automatische DNA-Sequenzierung 23
2.4.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 23
2.4.10 *3'-RACE* 24
2.4.11 Zielgerichtete Mutagenese 24
2.4.12 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten mit ^{32}P 24
2.5 RNA: Molekularbiologische Methoden 25
2.5.1 Northern Blot-Hybridisierung 25
2.5.2 Gewinnung von Gesamt-RNA aus Gewebe 25

2.5.3	Präparation von Geschmacksepithel zur RNA-Gewinnung	25
2.5.4	RT-PCR	26
2.5.5	Präparation von Rattenzungen zur Herstellung von Gewebeschnitten	26
2.5.6	Herstellung Digoxigenin markierter RNA-Sonden	26
2.5.7	*In situ* Hybridisierung an Dünnschnitten des Geschmacksstreifens und der cicumvallaten Papille	27
2.6	**Protein: Molekularbiologische und biochemische Methoden**	**27**
2.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.6.2	Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	28
2.6.3	Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)	28
2.6.4	Immunologische Detektion von Proteinen auf NC-Membranen	28
2.6.5	Expression und Aufreinigung rekombinant exprimierter Fusionsproteine	28
2.6.6	Dialyse	29
2.6.7	*In vitro* Translation von Proteinen	29
2.6.8	GST-*Pulldown Assay*	30
2.6.9	Immunhistochemie auf Gewebeschnitten der cirumvallaten Papille	30
2.7	**Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden**	**31**
2.7.1	Kultivierung von HEK293-Zellen	31
2.7.2	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	31
2.7.3	Transiente Transfektion primärer Hippocampus-Neurone	32
2.7.4	Zellextrakt aus kultivierten HEK293-Zellen	32
2.7.5	Immuncytochemie von transient transfizierten HEK293-Zellen	32
2.7.6	Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen für Calcium-*Imaging*-Versuche mittels FLIPR	33
2.7.7	Calcium-*Imaging* im heterologen Expressionssystem mittels FLIPR	33
2.8	**Arbeiten mit Hefen**	**34**
2.8.1	Transformation von Hefe-Zellen	34
2.8.2	β-Galactosidase-Assay	35

3 ERGEBNISSE 36

3.1 Identifizierung und Charakterisierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus der circumvallaten Papille der Ratte 36

3.1.1 Klonierungsstrategie 36

3.1.2 Sequenzanalyse von rTRX 38

3.1.3 Expressionsmuster von rTRX in Geweben der Ratte 43

3.1.3.1 RT-PCR-Analyse 43

3.1.3.2 *In situ* Hybridisierung 45

3.1.4 Untersuchungen zur Heterodimerisierung des rTRX mit dem rT1R3 aus der T1R-Familie 47

3.1.4.1 Lokalisationsexperimente im heterologen Expressionssystem 47

3.1.4.2 Co-Immunopräzipitation aus HEK293-Zellen 50

3.2 Charakterisierung der Interaktion des rCIB-Proteins mit der C-terminalen Domäne des rT1R2 aus der Ratte 52

3.2.1 Hefe Zwei-Hybrid-*Screen* 52

3.2.2 Sequenzanalyse von rCIB 52

3.2.3 Spezifität der Bindung 54

3.2.4 Identifizierung einer die Interaktion mit rT1R2 vermittelnden Domäne innerhalb des rCIB-Proteins 55

3.2.5 Expressionsmuster des rCIB in sensorischem Gewebe und anderer Organe der Ratte 57

3.2.5.1 Northern Blot 57

3.2.5.2 Immunhistochemie 58

3.2.5.3 RT-PCR 59

3.2.6 Verifizierung der Protein-Protein-Interaktion im GST-*Pulldown-Assay* 61

3.2.6.1 Expression und Aufreinigung von GST und dem GST-rCIB-Fusionsprotein 61

3.2.6.2 *In vitro* Expression von rT1R2 im Retikulocytenlysat 62

3.2.6.3 *Pulldown-Assay* 63

3.2.7 Co-Expression von rT1R2 und rCIB in HEK293-Zellen 65

3.2.8 Co-Immunopräzipitaion von rT1R2 und rCIB aus HEK293-Zellen 68

3.2.9 Subzelluläre Verteilung von rCIB in Abhängigkeit der N-Myristoylierung in HEK293-Zellen 70

3.2.10 Für die Interaktion mit rCIB essentielle Aminosäuren innerhalb des rT1R2 72

3.2.11 Einfluß von rCIB auf die Liganden-vermittelte Aktivierung von rT1R2+3 im heterologen Expressionssystem 73

4 DISKUSSION 77

4.1 Einordnung von rTRX in die Geschmacksrezeptorfamilie T1R 77

4.1.1 Sequenzanalyse des rTRX 78

4.1.2 Expressionsmuster des rTRX im chemosensorischen Gewebe 79

4.1.3 Heterodimerisierung innerhalb der T1R-Familie 81

4.2 Rolle der Interaktion des rCIB mit rT1R2 für den Süß-Geschmack 85

4.2.1 Expression von CIB in Geweben der Ratte 85

4.2.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion 86

4.2.3 Spezifität der interaktion von CIB und T1R2 86

4.2.4 Subzelluläre Verteilung von CIB in Abhängigkeit der Myristoyl-Gruppe und Ca^{2+} 88

4.2.5 Co-Lokalisationen im heterologen Zellsystem 90

4.2.6 Regulatorische Funktion des rCIB auf die Süß-Signaltransduktion 92

5. ZUSAMMENFASSUNG 95

6. LITERATURVERZEICHNIS 97

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AC	Adenylat-Cyclase
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
β-Gal	β-Galaktosidase
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-idolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	Calcium *sensing*-Rezeptor
CaM	Calmodulin
Ci	Curie (1Ci = $3{,}7 \times 10^{10}$ zefälle pro Sekunde)
CIB	Calcium- und Integrin-bindendes Protein
CnB	Calcineurin B
CSP	*Cacium sensor protein*
CV	Circumvallate Papille
cDNA	komplementäre DNA
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (*enhanced green fluorescent protein)*
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylenether)*N,N,N',N'*-tetraacetat)
ER	Endolasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum (*fetal calf serum*)
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GABA	γ-Aminobutyrat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GS	Geschmacksstreifen
GST	Glutathion-S-Transferase
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HC-Neurone	Hippocampus Neurone
HEK293	humane embryonale Nierenzellen (*human embryonic kidney*)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRP	(*horse raddish peroxidase*)
IgG	Immunglobulin G
IP_3	Inositoltrisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-d-Thiogalctopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria Broth

mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
mRNA	messenger RNA
NBT	Nitroblautetrazol
NCS	*neuronal calcium sensors*
NP-40	Nonidet P-40
NC	Nitrocellulose
nt	Nukleotid(e)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PEG	Polyethylenglycol
PKC	Protein-Kinase C
PLC	Phospholipase C
PM	Plasmamembran
PI-Cocktail	Proteaseinhibitor-Cocktail
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Salz-Natriumcitrat-Lösung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	*N,N,N',N'*-Tetraethylendiamin
T1R	*taste one receptor*
Tris-HCl	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan-Chlorid
TMR	Transmembranregion
TMD	Transmembrandomäne
TRP	*transient receptor potential*
U	Enzymeinheit (units)
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Das gustatorische System

Der Geschmackssinn erfasst die Informationen über die biochemischen Eigenschaften und die Qualität aufgenommener Nahrung, wobei der olfaktorische und der visuelle Sinn die Beurteilung eines Nahrungsmittels mit beeinflusst.

Säugetiere sind in der Lage, auf ein vielfältiges Repertoire an chemischen Substanzen zu reagieren, die den fünf Geschmacksmodalitäten salzig, sauer, süß, bitter und umami (wohlschmeckend - der Geschmack von Glutamat) zugeordnet werden (Lindemann, B., 1996).

Die primäre Geschmacksperzeption erfolgt auf der Zunge und dem Gaumensegel in den Geschmackspapillen, die hinsichtlich ihrer Verteilung auf der Zunge und ihrer Form als fungiforme, foliate und circumvallate Papillen bezeichnet werden (Abb. 1.) Die Papillen am Gaumen von Nagetieren liegen im sogenannten Geschmacksstreifen. In den Papillen befinden sich die zwiebelartig geformten Geschmacksknospen, in denen neben basalen und unterstützenden Zellen die Geschmackssinneszellen länglich angeordnet vorliegen. Die Sinneszellen sind polare Zellen, deren apikale Seite zur Oberflächenvergrößerung aus Mikrovilli besteht, auf denen die für die Geschmacksperzeption verantwortlichen Rezeptoren und Kanäle lokalisiert sind. Diese Zellfortsätze ragen aus der vom Zungenepithel gebildeten Pore heraus und sind somit mit dem Mundraum verbunden (Lindemann, B., 1996).

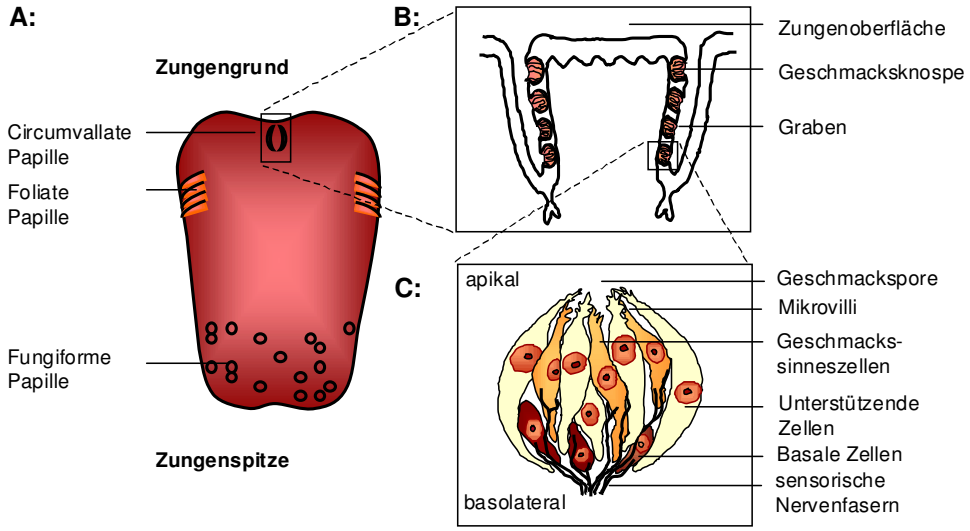


Abb. 1: Aufbau des Geschmackepithels bei der Ratte
Schematische Darstellung der Zunge mit den darauf befindlichen Geschmackspapillen (A), einer circumvallaten Papille mit den darin enthaltenen Geschmacksknospen (B) und einer Geschmacksknospe, den darin enthaltenen Sinneszellen mit apikalen Mikrovilli und basolateralen Synapsen sowie den afferenten Nervenfasern (C).

Die Geschmackssinneszellen von Säugetieren sind keine Nervenzellen. Dennoch sind sie wie diese in der Lage nach Aktivierung ihre elektrischen Ladungsverhältnisse zu verändern, was zur Freisetzung von Neurotransmittern an ihrer basolateralen Seite führt. Nervenzellen, deren afferenten Fasern mit den Sinneszellen Synapsen ausbilden, fangen diese neuronalen Botenstoffe auf und leiten sie umgewandelt als elektrische Signale zum Geschmackszentrum im Gehirn weiter (Herness, M.S. & Gilbertson, T.A., 1999).

Die Grundgeschmacksqualitäten erregen die Sinneszellen in jeweils eigener Weise: Die Weiterleitung des salzigen und sauren Geschmacks wird über die Kationen Na^+, K^+ und H^+ vermittelt. Bei Nagetieren werden salzige Substanzen über den Amilorid-sensitiven Natrium-Kanal ENaC (*epithelial sodium channel*) vermittelt (Heck, G.L. *et al.*, 1984; Canessa, C.M. *et al.*, 1994). Ein entsprechender humaner Salz-Rezeptor ist bisher nicht identifiziert (Lindemann, B., 2001). Die Protonen saurer Substanzen können ebenfalls durch den ENaC in die Zelle gelangen (Gilbertson, T.A. *et al.*, 1993). Sie können zudem Kanäle modifizieren, wie es für den MDEG1 (*mammalian degenerin channel*), einen unspezifischen H^+-gesteuerten Kationen-Kanal, einen K^+-Kanal bei *Necturus*, sowie einen HCN (*hyperpolarization-activated cation channel*) beschrieben ist (Kinnamon, S.C. *et al.*, 1988; Ugawa, S. *et al.*, 1998; Miyamoto, T. *et al.*, 1998; Miyamoto, T. *et al.*, 2000; Stevens, D.R. *et al.*, 2001). Für beide Geschmacksrichtungen erfolgt eine Depolarisation der Zelle, die nach Calcium-Einstrom neuronale Botenstoffe freisetzt.

Die Wahrnehmung der Geschmacksqualitäten süß, bitter und umami wird über komplexere Mechanismen vermittelt. Hierbei werden über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) Signaltranduktionskaskaden in den Zellen eingeleitet, die ebenfalls zur Freisetzung von Neurotransmittern führen.

In Abb. 2 sind die Geschmacksrezeptoren in ihrer Membrantopologie aufgeführt, die an der Weiterleitung der fünf Geschmacksmodalitäten beteiligt sind.

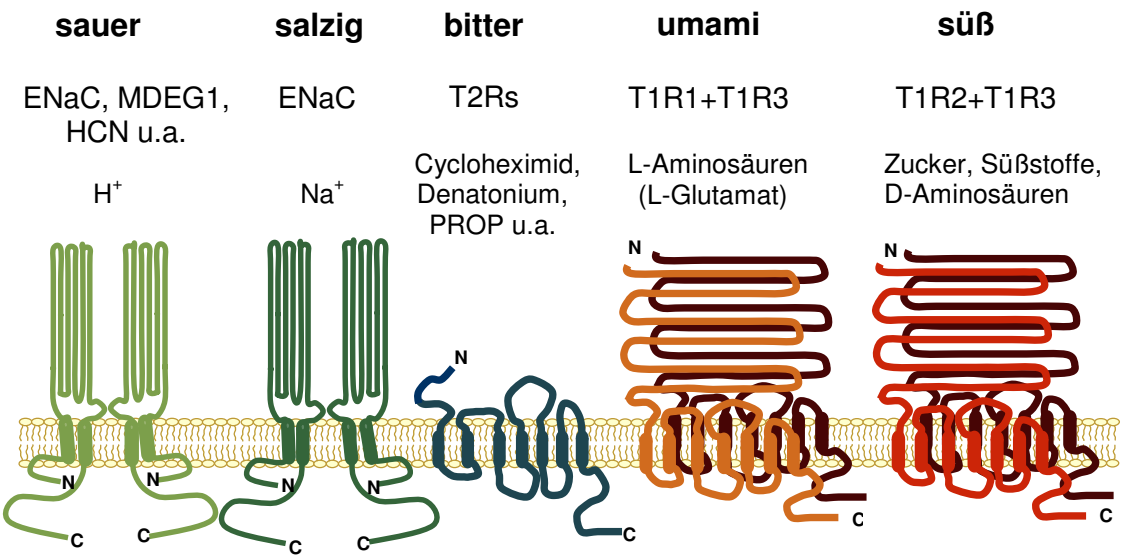


Abb. 2: Geschmacksrezeptoren in ihrer Membrantopologie
Schematische Darstellung der Ionenkanäle, die salzig und sauer vermitteln, sowie der GPCRs, die an der Weiterleitung des Bitter-, Umami- und Süßgeschmacks beteiligt sind.

1.2 Molekularbiologische Grundlagen des Bitter-, Umami- und Süß-Geschmacks

In den letzten vier Jahren hat die Identifizierung der Rezeptoren für bitter (Matsunami, H. *et al.*, 2000; Adler, E. *et al.*, 2000; Chandrashekar, J. *et al.*, 2000), umami (Nelson, G. *et al.*, 2002; Li, X. *et al.*, 2001) und süß (Hoon, M. A. *et al.*, 1999, Nelson, G. *et al.*, 2001) einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis von Weiterleitung und Codierung des Geschmacks beigetragen.

Die Familie der Bitter-Rezeptoren, T2R, wird abzüglich der Pseudogene bei Mensch und Nagern auf 40-80 Mitglieder geschätzt (Adler, E. *et al.*, 2000). Durch genetische Studien konnte auf dem Chromosom 5 des Menschen ein Locus identifiziert werden, der mit der Fähigkeit, die Bittersubstanz PROP (6-n-propyl-2-thiouracil) schmecken zu können, assoziiert ist (Reed, D.R. *et al.*, 1995). Sequenz-Analysen in diesem Genom-Intervall führten zur Identifizierung eines GPCRs, des T2R1 (Adler, E. *et al.*, 2000). Die Durchsuchung von Datenbanken nach ähnlichen Rezeptoren führte zur Identifizierung weiterer Rezeptoren. Diese befinden sich überwiegend in Clustern auf den Chromosomen 12 und 7 des Menschen und in syntänen Bereichen auf den Chromosomen 15 und 6 der Maus. Das Cluster der Rezeptorgene auf Chromosom 6 der Maus liegt in den Loci *Soa*, *Rua* und *Qui*, die schon durch frühere Untersuchungen in Zusammenhang mit Bitterperzeption gebracht wurden (Warren, R.P. & Lewis, R.C., 1970; Fuller, J.L., 1974). Diese Rezeptoren zeichnen sich durch einen kurzen N-Terminus aus und zeigen untereinander eine Aminosäure-Identität von 30-70% auf

(Adler. E. *et al*., 2000). Untersuchungen zur Liganden-vermittelten Rezeptoraktivierung im heterologen Zellsystem führten unterstützt durch die genetischen Studien zu der Erkenntnis, dass es sich bei dieser Rezeptorfamilie um Bitter-Rezeptoren handelt. Eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber der Bittersubstanz Cycloheximid bei einigen Maus-Stämmen („Schmecker“ und „Nicht-Schmecker“) beruht auf Mutationen innerhalb des T2R5-Gens (Chandrashekar, J. *et al*., 2000).

Expressionsanalysen durch *in situ* Hybridisierungen konnten zeigen, dass nahezu alle Bitter-Rezeptoren in einer T2R-positiven Geschmackssinneszelle coexprimiert werden (Adler, E. *et al*., 2000). Um das weite Spektrum an chemisch unterschiedlichen Bittersubstanzen detektieren zu können, wird die Ausbildung von Heterodimeren postuliert (Zhang, Y. *et al*., 2003).

Nicht verwandt mit dieser Familie sind die bisher bekannten drei Mitglieder der T1R-Familie: T1R1, T1R2 und T1R3. Hoon, M.A. *et al.* (1999) klonierten die „orphan“ Rezeptoren T1R1 und T1R2, die bei der Ratte und der Maus ein definiertes Expressionsmuster hinsichtlich ihrer Verteilung in den Geschmackspapillen von Nagetieren aufweisen. T1R1 wird hauptsächlich in fungiformen Papillen, im Geschmacksstreifen und schwächer in foliaten Papillen exprimiert. Im Gegensatz dazu kommt T1R2 in circumvallaten und foliaten Papillen prominent, aber nur schwach im Geschmacksstreifen vor. Die Identifizierung des T1R3 zeitgleich durch Max, M. *et al*. (2001), Montmayeur, J.P. *et al*. (2001), Kitagawa, M. *et al*. (2001) und Sainz, E. *et al*. (2001) gab schließlich mehr Aufschluss über die Funktion dieser Rezeptorfamilie. Durch genetische Studien konnte schon früher ein Locus auf dem Chromosom 4 der Maus identifiziert werden, der sogenannte *Sac*-Locus, der bei einigen Maus-Stämmen für die Sensibilität gegenüber süßen Geschmacksstoffen wie Saccharin verantwortlich ist (Fuller, J.L., 1974; Lush, I.E., 1989). T1R3 liegt in dem *Sac*-Locus und wie jetzt festgestellt, beruht die unterschiedliche Sensibilität gegenüber den Süßstoffen auf zwei Polymorphismen innerhalb des T1R3-Gens (Sainz, E. *et al*., 2001; Nelson, G. *et al*., 2001). Die Gene für T1R1 und T1R2 sind ebenfalls am distalen Ende des Chromosoms 4 von Maus, bei der Ratte auf Chromosom 5 und beim Menschen auf Chromosom 1 lokalisiert (Li, X. *et al*., 2001; Hoon, M.A. *et al*., 1999).

Der Rezeptor T1R3 wird von 30% der Zellen in den fungiformen, foliaten und circumvallaten Papillen sowie des Geschmacksstreifens exprimiert. In jeder T1R1- und jeder T1R2-positiven Zelle ist auch T1R3 vorhanden. In den Papillen des Geschmacksstreifens und den fungiformen Papillen kommen zudem Zellen vor, die nur T1R3 alleine aufweisen (Nelson, G. *et al*., 2001). Durch Studien zur Liganden-vermittelten Rezeptoraktivierung im heterologen Expressionssystem konnte gezeigt werden, dass die Rezeptoren T1R2 und T1R3 in Kombination durch Saccharose,

Fructose, einige D-Aminosäuren sowie durch die artifiziellen Süßstoffe GA-1 (*guanidinoacetic acid*), GA-2, Acesulfam K, Saccharin und Dulcin aktiviert werden (Nelson, G. *et al.*, 2001). Ebenfalls konnte durch vergleichbare Studien die Stimulierung der humanen Rezeptoren in der Kombination T1R1 und T1R3 durch L-Glutamat beobachtet werden (Li, X. *et al.*, 2002). Die orthologen Rezeptoren aus der Maus werden neben L-Glutamat durch mehrere L-Aminosäuren stimuliert (Nelson, G. *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Studien und dem dazu im Geschmacksgewebe korrelierenden Expressionsmusters von T1R1, -2 und -3 wird für den Süß-Rezeptor die Ausbildung des Heterodimers T1R2+T1R3 und für den Umami-Rezeptor die des Heterodimers T1R1+T1R3 angenommen.

1.3 Dimerisierung

Die Mitglieder der T1R-Familie zeichnen sich durch einen langen ungefähr 500 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Aminoterminus sowie durch einen sehr kurzen 30-40 Aminosäuren umfassenden intrazellulären Carboxyterminus aus. Aufgrund ihrer strukturellen Charakteristika werden sie der Subfamilie C innerhalb der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zugeordnet (Hermans, E. & Challis, R.A.J., 2001). Zu dieser Gruppe gehören ebenfalls die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluR), die Calcium *Sensing*-Rezeptoren (CaSR), *Gamma-aminobutyric acid* B-Rezeptoren ($GABA_BR$) sowie eine Gruppe olfaktorischer (OR) und vomeronasaler Rezeptoren (V2R). Auf der Grundlage der Röntgenstrukturanalyse der extrazellulären Domäne des mGluR1 sowie durch eine deutliche Sequenzähnlichkeit zu einem bakteriellen periplasmatischen Leucin/Isoleucin/Valin-Bindungsprotein (LIV-BP) kann für diese Rezeptoren der N-Terminus als Ligandenbindungsdomäne charakterisiert werden (Kunishima, N. *et al.*, 2000). Dabei wird das Modell der „Venus Fliegenfalle“ als Bindetasche für den Liganden angenommen (Parmentier, M.L. *et al.*, 2002; Bessis, A.S. *et al.*, 2002).

Viele Rezeptoren aus dieser Subfamilie bilden an der Zelloberfläche Homo- oder Heterodimere aus, wobei unterschiedliche Mechanismen und Domänen der Rezeptoren an der Dimerisierung beteiligt sind. Eine Besonderheit einiger GPCRs ist eine Cystein-reiche Region innerhalb der extrazellulären N-terminalen Domäne in der Nähe der ersten Transmembranregion. In Mutationsanalysen und Co-Immunopräzipitationen konnte für den mGluR5, den mGluR1 und für den CaSR gezeigt werden, dass Disulfidbrücken an der Rezeptor-Dimerisierung beteiligt sind (Romano, C. *et al.*, 1996; Robbins, M.J. *et al.*, 1999; Fan, G.F. *et al.*, 1998; Pace, A.J., *et al.* 1999). Aber auch Transmembranregionen oder intrazelluläre Domänen können

für die Dimerisierung verantwortlich sein. Die Dimerisierung findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) statt, wobei der Status der Oligomerisierung bei den Rezeptoren einen wesentlichen Einfluss auf den Transport und die Zielsteuerung zur Zelloberfläche hat (Hermans, E. & Challiss, R.A.J., 2001). So ist für die $GABA_B$-Rezeptoren $GABA_BR1$ und $GABA_BR2$ die Heterodimerisierung notwendig, um an die Membran zu gelangen. Wenn der Rezeptor $GABA_BR1$ alleine exprimiert wird, verbleibt er aufgrund eines ER-Retentionssignals im ER. Der $GABA_BR2$ hingegen gelangt an die Zelloberfläche, zeigt aber nur geringe Affinität zu GABA (Kaupmann, K. *et al.*, 1998; Jones, K.A. *et al.*, 1998). Erst nach Ausbildung des Heterodimers gelangen beide Rezeptoren an die Oberfläche und können so durch ihren Agonisten GABA aktiviert werden. Dabei ist an der Dimerisierung die Interaktion der intrazellulären C-Termini beteiligt (White, J.H. *et al.*, 1998), durch die das ER-Retentionssignal des $GABA_B$ R1 maskiert wird.

Experimente zur Ligandenbindung mit den Rezeptoren der T1R-Familie haben gezeigt, dass diese im heterologen Expressionssystem nur als Heterodimere in den Kombinationen T1R1+3 und T1R2+3, nicht aber als Homodimere funktionell sind (Nelson, G. *et al.*, 2001). Allerdings konnte bisher im heterologen Zellsystem keine eindeutige Lokalisierung der heterodimeren Rezeptoren an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Diese Schwierigkeit wurde ebenfalls für andere sensorische Rezeptoren beschrieben (Dwyer, N.D. *et al.*, 1998; Krautwurst, D. *et al.*, 1998; Chandrashekar, J. *et al.*, 2000).

Bislang ist eine essentielle Heterodimerisierung zur Ausbildung eines funktionellen Rezeptors nur für die $GABA_B$-Rezeptoren sowie für die Mitglieder der T1R-Familie bekannt (Angers, S. *et al.*, 2002).

1.4 Signalwege und Codierung des Süß-Geschmacks

Die Umsetzung eines extrazellulären Signals nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch seinen Liganden erfolgt durch einen generellen Mechanismus, der initial über ein heterotrimeres GTP-bindendes Protein (G-Protein) zu intrazellulären Veränderungen führt. Durch die Ligandenbindung erfährt der Rezeptor eine Konformationsänderung, woraufhin der GDP-GTP-Austausch und die Dissoziation des trimeren G-Proteins in seine α ($G\alpha$-GTP)- und $\beta\gamma$ ($G\beta\gamma$)-Untereinheiten erfolgt. Beide Untereinheiten können Reaktionskaskaden in Gang setzen, die zur Generierung intrazellulärer Signalmoleküle (*second messenger*) führen.

Die Signalweiterleitung ist für die Mitglieder der T1R-Familie noch weitestgehend unverstanden. Basierend auf elektrophysiologischen Studien kombiniert mit

biochemischen Analysen sind sowohl cAMP als auch Ins(1,4,5)P_3 als Signalmoleküle in der Weiterleitung des Süßgeschmacks involviert (Lindemann, B., 2001). Durch Calcium-*Imaging*-Experimente an isolierten Geschmacksknospen konnte nach Stimulation mit Zucker (Saccharose) ein Ca^{2+}-Einstrom aus dem extrazellulären Raum in die Zelle beobachtet werden (Bernhardt, S.J. *et al.*, 1996). Dies deutet darauf hin, dass durch Zucker über eine $G_{\alpha s}$-Untereinheit die Aktivierung der Adenylat-Cyclase erfolgt, die aus ATP unter Abspaltung von Diphosphat cAMP cyclisiert und dadurch eine cyclische Nukleotidkaskade in Gang setzt. Dabei kann zum einen cAMP als allosterischer Effektor die Aktivierung der Protein-Kinase A bewirken, die daraufhin die Phosphorylierung eines K^+-Kanals katalysiert. Die dadurch hervorgerufene Schließung des K^+-Kanals führt zur Depolarisation und zur Öffnung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle, über die Ca^{2+} eintreten kann. Zum anderen kann cAMP/cGMP über den Kationen-Kanal $CNG_{gust.}$ (*cyclic nucleotide gated channel*) den Einstrom von Kationen in die Zelle bewirken (Misaka,T. *et al.*, 1997).

Artifizielle Süßstoffe hingegen bewirken die Ca^{2+}-Freisetzung aus intrazellulären Speichern über die Ins(1,4,5)P_3-Kaskade. Dabei wird über die Aktivierung einer $G_{\alpha q}$-Untereinheit die Phospholipase $C\beta_2$ (Rossler, P. *et al.*, 1998) stimuliert, durch die nach Hydrolyse des in der Lipiddoppelschicht der Plasmamembran vorkommenden PIP_2 (Phosphatidyl-inositolbisphosphat) DAG (Diacylglycerol) und Ins(1,4,5)P_3 entstehen. Das Ins(1,4,5)P_3 führt zur Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Die Art der Signalübertragung wäre damit ligandenabhängig, wobei beide Wege in ein und derselben Geschmacksrezeptorzelle coexistieren (Abb. 3 A). Zudem muss angenommen werden, dass ein Rezeptor-Dimer wie T1R2+T1R3, der sowohl durch Zucker als auch durch künstliche Süßstoffe aktiviert wird, beide Wege einschlagen kann (Bernhardt, S.J. *et al.*, 1996).

Neueste Untersuchungen weisen darauf hin, dass es für süß, bitter und umami einen gemeinsamen Signalweg gibt, an dem Phospholipase $C\beta_2$ ($PLC\beta_2$) und TRPM5, ein im Geschmacksgewebe prominent exprimierter TRP-Ionenkanal (*transient receptor potential channel*) (Perez, C.A. *et al.*, 2002), beteiligt sind (Abb. 3 B). TRP-Kanäle spielen in vielen physiologisch unterschiedlichen Prozessen eine Rolle. Hierzu gehört z.B. im sensorischen System die Phototransduktion bei *Drosophila* (Minke, B. & Cook, B., 2002). Für die Aktivierung von TRP-Kanälen werden unterschiedliche Mechanismen angenommen. Dabei kann unter anderem die Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern TRP-Kanäle aktivieren und einen Ca^{2+}-Einstrom aus dem extrazellulären Raum bewirken, wie es ebenfalls für den TRPM5 angenommen wird (Perez, C.A. *et al.*, 2002). Untersuchungen an $PLC\beta_2$- und TRPM5-*knockout*-Mäusen

zeigten, dass nach Zugabe von süßen und bitteren Substanzen sowie Aminosäuren keine induzierten Aktionspotentiale an den Geschmackshauptnerven C*horda tympani* und *Nervus glossopharyngeus* gemessen werden konnten. Mit salzigen oder sauren Substanzen hingegen konnten Aktionspotentiale gemessen werden (Zhang, Y. *et al.*, 2003).

Die Rolle des im Geschmacksgewebe spezifisch exprimierten G-Proteins Gustducin in der Geschmacksperzeption ist nicht klar. Seine Bezeichnung, die soviel wie „geschmacksleitend" bedeutet, wurde von der des G-Proteins Transducin im visuellen System abgeleitet. Eine Beteiligung von Gustducin an der Signaltransduktion des Geschmacks konnte bisher nur für den Bitter-Rezeptor T2R5 aus der Maus nachgewiesen werden (Chandrashekar, J., *et al.*, 2000). Allerdings zeigen α-Gustducin-*knockout*-Mäuse sowohl eine geringere Sensitivität gegenüber den Bittersubstanzen Denatonium und Chinin als auch gegenüber den Süßsubstanzen Saccharin und Saccharose (Wong, G.T. *et al.*, 1996; Ruiz-Avila, L. *et al.*, 2001). α-Gustducin ist somit an der Weiterleitung bzw. Modulation beider Geschmacksqualitäten beteiligt. Signalwege, die unabhängig von α-Gustducin sind, können nicht ausgeschlossen werden, was Untersuchungen mit einer dominant-negativen Mutante von α-Gustducin bestätigten (Ruiz-Avila, L. *et al.*, 2001).

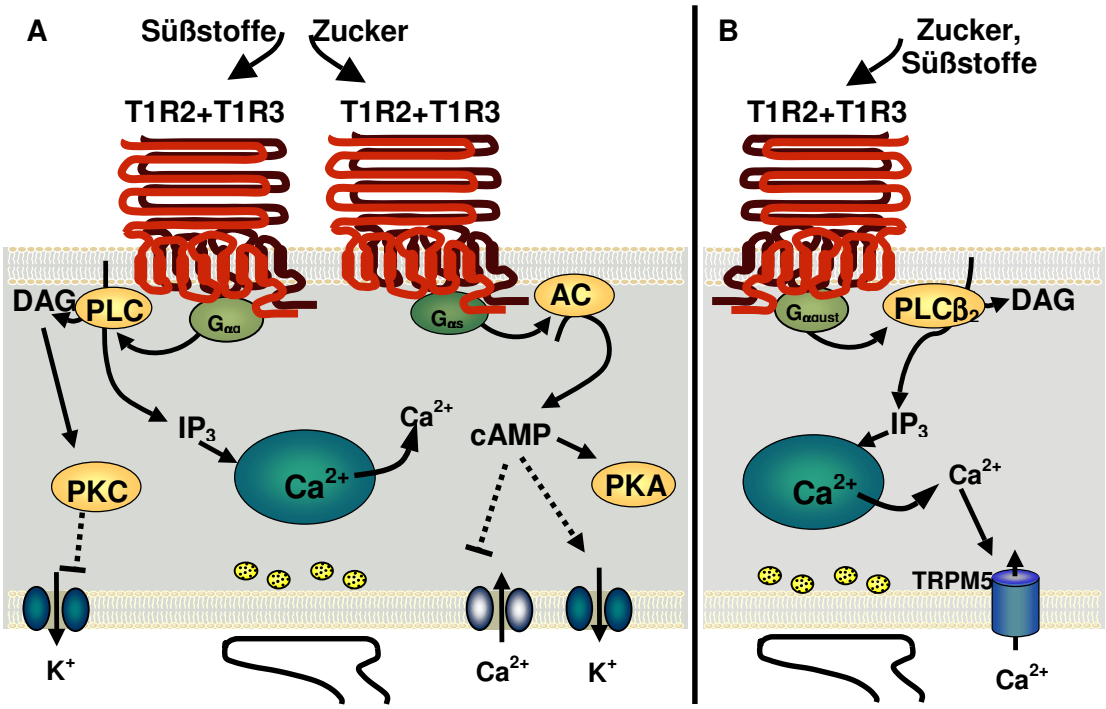


Abb. 3: Konkurrierende Modelle zur Signaltransduktion des Süßgeschmacks
A: Dargestellt ist die Generierung der beiden *second messenger* IP_3 und cAMP hervorgerufen durch die Aktivierung des T1R2+3 durch künstliche Süßstoffe über Phospholipase C (PLC) und Zucker über Adenylat-Cyclase (AC).
B: Ausgehend von einem gemeinsamen Signalweg, der auch für den Bitter- und Umami-Geschmack zutreffen kann, bewirkt die Aktivierung des T1R2+3 für künstliche Süßstoffe sowie für Zucker die Generierung von IP_3 über $PLC\beta_2$. Auf die Freisetzung intrazellulären Ca^{2+} erfolgt die Öffnung des TRPM5.

Inwieweit diese beobachteten Signalwege als Haupt- oder Nebenwege an der zentralen Weiterleitung und Wahrnehmung der Geschmacksmodalitäten süß, umami und bitter beteiligt sind, ist zum gegebenen Zeitpunkt noch Spekulation. Für deren Codierung stehen sich zwei Hypothesen gegenüber:
Einerseits wird die Expression unterschiedlicher Rezeptortypen innerhalb einer Zelle postuliert. Um die verschiedenen Geschmacksrichtungen getrennt weiterleiten zu können, werden unterschiedliche ligandenabhängige Signalwege eingeschlagen (Caicedo, A. *et al.*, 2002; Gilbertson, T.A. *et al.*, 2001; Margolskee, R.F. 2002). Dabei muss die Information der einzelnen Geschmacksrichtungen in den Geschmackszellen und durch ein „*across-fibrepattern*" der sensorischen Nerven entschlüsselt werden.
Andererseits zeigen Expressionsanalysen im Geschmacksgewebe weitestgehend keine Coexpression des Umami-Rezeptors T1R1+3, des Süß-Rezeptors T1R2+3 und der Bitter-Rezeptoren. Aufgrund der Untersuchungen an *knockout*-Mäusen und der Ähnlichkeit zu anderen Modellen aus dem olfaktorischem System (Brunet, L.J. *et al.*, 1996) und dem vomeronasalen System (Stowers, L. *et al.*, 2002; Leypold, B.G. *et al.*, 2002) wird vermutet, dass bitter, süß und umami den gleichen Signalweg benutzen. Von einer Geschmacksrezeptorzelle wird nur eine Modalität vermittelt und löst somit immer dieselbe Empfindung aus (Zhang, Y. *et al.*, 2003). Demzufolge ist jede afferente Nervenfaser nur für eine Geschmacksqualität responsiv, und es würde somit eine „*labelled-line*-Codierung" vorliegen.

1.5 Funktionelle Rolle intrazellulärer GPCR-interagierender Proteine

Die Vielfältigkeit und Spezifität der Signalwege von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird zusätzlich durch eine Vielzahl interagierender Proteine reguliert.
Dabei werden insbesondere Proteine, die Wechselwirkungen mit der intrazellulären C-terminalen Domäne von GPCRs eingehen, Funktionen innerhalb unterschiedlicher Bereiche zugeschrieben (Hall, R.A. & Lefkowitz, R.J., 2002).

Chaperone zur Vermittlung der Zielsteuerung von GPCRs:
Eine korrekte Lokalisierung der GPCRs zu den relevanten zellulären Kompartimenten an der Plasmamembran ist von fundamentaler Bedeutung für ihre Funktion (Dev, K.K. *et al.*, 2001). Dabei können interagierende Proteine als Chaperone am Transport sowie der Zielsteuerung von GPCR zur Plasmamembran beteiligt sein.
Expressionsstudien in kultivierten Hippocampus Neuronen haben für den mGluR7 gezeigt, dass die mittlere Region des C-Terminus relevant für eine axonale Zielsteuerung ist, wobei dies nicht alleine von einem Signal innerhalb des Rezeptors

ausgeht. Es werden hierbei vielmehr bisher unbekannte Proteine vermutet, die den richtigen Transport vermitteln (Stowell, N.J. & Craig, A.M., 1999).
An der Stabilisierung sowie der richtigen Faltung von Rhodopsin zur Vermittlung der Zelloberflächenexpression in *Drosophila melanogaster* ist NINA A (*neither inactivation nor afterpotential A*) beteiligt (Schneuwly, S. *et al.*, 1989). Mutationen im NINA A-Gen führen zu einer verringerten Menge von Rhodopsin in den Photorezeptoren. Auch für olfaktorische Rezeptoren werden Chaperone vermutet, die in olfaktorischen Neuronen spezifisch exprimiert werden, da diese Rezeptoren im heterologen Zellsystem im ER oder im Golgi-Apparat zurückgehalten werden (Brady, A.E. & Limbird, L.E., 2001).

Gerüstproteine zur Organisation eines „Signalosoms“:
Die Signalweiterleitung eines GPCRs ist umso effektiver, je mehr die beteiligten Signalmoleküle in räumlicher Nähe zueinander stehen. Sogenannte Gerüstproteine (*scaffold proteins*), die meist aus mehreren evolutionär konservierten Protein-Protein-Interaktionsdomänen bestehen, verbinden diese Signalmoleküle zur Ausbildung eines Signalkomplexes, dem sogenannten „Signalosom“. Beispiele hierfür sind SH2 (*Scr-homology 2*), SH3, PTB (*Phosphotyrosine binding*) und PDZ (*postsynaptic-densitiy-95/ Discs-large/ ZO1*). Die Funktion solcher Gerüstproteine ist ausführlich im visuellen System von *Drosophila melanogaster* für das Protein INAD (*inactivation no afterpotential D*) untersucht: INAD besitzt fünf PDZ-Domänen, die die Ausbildung eines heteromultimeren Proteinkomplexes, des „Transduciosoms“, aus PLC, PKC, TRP und Rhodopsin vermitteln (Huber, A., 1996; Chevesich, J. *et al.*, 1997; Xu, X.Z. *et al.*, 1998; Wes, P.D. *et al.*, 1999). Dadurch wird die Signalspezifität und Geschwindigkeit der Photodransduktion gesteigert (Huber, A. *et al.*, 1996; Tsunoda, S. *et al.*, 1997).
Ebenso gibt es mehrere Beispiele von Gerüstproteinen, die an der räumlichen Organisation von synaptischen Proteinen beteiligt sind. Das Protein PICK1, das eine PDZ-Domäne enthält, interagiert mit dem extremen C-Terminus des mGluR7 (Boudin, H. *et al.*, 2000). Es zeigt ebenfalls Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, wie z.B. der Untereinheit des AMPA-Rezeptors oder Epinephrinrezeptor-Tyrosin-Kinasen (Torres, R. *et al.*, 1998; Dev, K.K. *et al.*, 1999). PICK1 kann ein Homodimer ausbilden, wodurch über beide PDZ-Domänen interagierende Proteine in Verbindung gebracht werden können (Staudinger, J. *et al.*, 1999).
Ebenfalls kann über Gerüstproteine eine indirekte Assoziation des Rezeptors mit dem Cytoskelett erfolgen, wodurch dieser mit den Effektormolekülen indirekt am Zielort verankert ist. So stellt Shank1, ein Multidomänen-Protein aus der Postsynapse, eine Verbindung des Somatostatin-Rezeptors 2 (SSTR2) zum Cytoskelett dar. Dabei kann Shank1 Wechselwirkungen mit α-Fodrin und Cortactin eingehen, wobei diese Proteine mit Aktinfilamenten interagieren (Kreienkamp, H.-J. *et al.*, 2002).

Abgesehen von Funktionen zur Zielsteuerung und Organisation können interagierende Proteine auch an der Signalweiterleitung des Rezeptors beteiligt sein. Dies kann zum einen durch eine direkte Beeinflussung der Signaltransduktion oder zum anderen durch die Regulation der Rezeptoraktivität erfolgen.

Effektor-Moleküle innerhalb der Signaltransduktion:
Proteine, die direkt an der Signaltransduktion eines Rezeptors beteiligt sein können, sind ebenfalls für den mGluR7 beschrieben. Die Gβγ-Untereinheiten binden an den C-Terminus des mGluR7 proximal der Transmembranregion (O´Connor, V. *et al.*, 1999). In diesem Bereich des C-Terminus kann ebenfalls Calmodulin (CaM) binden, wobei es aber nicht mit Gβγ um eine Bindung konkurriert. Dennoch fördert CaM die Dissoziation des Gβγ vom mGluR7, worauf eine durch die Gβγ-vermittelte Inhibierung spannungsabhängiger Ca^{2+}-Kanäle erfolgen kann (Dev, K.K. *et al.*, 2001). Die CaM-Binderegion enthält eine Konsensus-Sequenz zur Phosphorylierung durch die Protein-Kinase C (PKC). Es besteht hierbei eine Konkurrenz zwischen CaM-Bindung und der Phophorylierung des Rezeptors, wie es ebenfalls für den mGluR5 beschrieben ist (Minakami, R. *et al.*, 1997). Das Zusammenspiel von PKC, CaM und Gβγ vermittelt vermutlich die Kopplung des G-Proteins an den mGluR7 (Dev, D.D. *et al.*, 2001).
Somit ist der mGluR7 ein Beispiel eines Rezeptors, der über unterschiedliche Bereiche seines C-Terminus mit Proteinen Wechselwirkungen eingehen kann, die nachfolgend unterschiedliche Funktionen ausüben (Abb. 4).

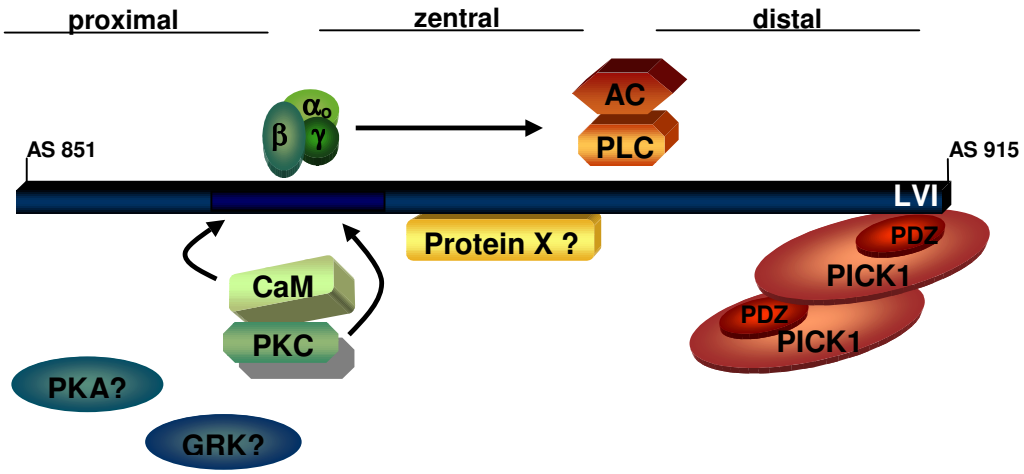


Abb. 4: Interaktionspartner der mGluR7 C-terminalen Domäne
Dargestellt ist der C-Terminus des mGluR7 und die Bereiche, über die die Interaktionen mit G-Proteinen, CaM, und PICK1 sowie Phosphoylierung durch Protein-Kinase C (PKC) vermittelt werden. Die zentrale Region ist beteiligt am axonalen Transport, wobei involvierte Proteine nicht identifiziert sind. mGluR7 ist über G-Proteine an Adenylat-Cyclase (AC) und Phospholipase C (PLC) gekoppelt. Inwieweit durch Phosphorylierungen des Rezeptors durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRKs) oder Protein-Kinase A (PKA) diese an der Desensitisierung und/oder Internalisierung beteiligt sind, ist bisher unklar (Dev, K.K. *et al.*, 2001).

Auch die Rezeptor-Abschaltung wird durch Phosphorylierung reguliert. Hierbei spielen Proteine, die an Regulationsmechanismen zur Desensitisierung sowie der Resensitisierung beteiligt sind, eine wesentliche Rolle, um den Rezeptor vor einer Überstimulierung zu bewahren.

Die homologe Desensitisierung steht im Zusammenhang mit einer Familie von Serin/Threonin (S/T)-Kinasen, die der GRK-Familie (G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen) angehören (Freedmann, N.J. & Lefkovitz, R.J., 1996; Chuang, T.T. *et al.*, 1996; Palczewski, K., 1997; Krupnick, J.G. & Benovic, J.L., 1998). Die durch Agonisten-Stimulation erfolgte Konformationsänderung eines Rezeptors führt zu seiner Phosphorylierung am C-Terminus oder am dritten intrazellulären Loop durch GRKs. Die auf diese Weise phosphorylierten Rezeptoren sind nur minimal desensitisiert, haben aber eine erhöhte Affinität zu Arrestin, die bei vielen GPCRs zu einer Internalisierung in endosomale Vesikel führt (Sallese, M. *et al.*, 2000).

Da nur sechs Gene bekannt sind, die für die GRKs codieren, kann die Spezifität für Rezeptoren nicht allein über diese Kinasen vermittelt werden. Vielmehr werden intrazelluläre Mechanismen postuliert, die die Aktivität von GRKs und somit die Selektivität der Interaktion mit dem Rezeptor regulieren (Iacovelli, L. *et al.*, 1999). So wird einer Reihe von CSPs (*calcium sensor proteins*) die selektive Regulation der GRK-Subtypen in Abhängigkeit von der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration zugesprochen (Iacovelli, L. *et al.*, 1999).

Zu diesen CSPs gehört eine Klasse an Proteinen, die EF-Handmotive besitzen. Dieses Motiv besteht aus einer Helix-Schleife-Helix-Einheit, die Ca^{2+} bindet. Ca^{2+} wird mit einer hohen Affinität von CSPs gebunden, die daraufhin eine Ca^{2+}-induzierte Konformationsänderung erfahren und dadurch an unterschiedlichen regulatorischen Mechanismen beteiligt sein können. CSPs repräsentieren eine heterogene Klasse von Proteinen, zu der Calmodulin, Mitglieder der S 100-Familie, NCS (*neuronal calcium sensor*) wie Recoverin, VILIP (*visin-like protein*), Neurocalcin, Hippocalcin sowie eine Gruppe von CABP (*retinal calcium-binding proteins*) gehören (Sallese, M., *et al.*, 2000).

Als sehr spezifisch wird die Regulation der Rhodopsin-Kinase GRK1 durch Recoverin im visuellen System beschrieben. In Anwesenheit von Ca^{2+} verringert Recoverin die katalytische Aktivität von GRK1 (Klenchin, V.A. *et al.*, 1995 und Chen, C.K. *et al.*, 1995). Die Eigenschaft zur Regulation der GRK1 ist auf Recoverin sowie einiger NCS beschränkt. Ca^{2+}/Calmodulin hingegen kann sowohl auf GRK4, GRK5 sowie auf GRK6 inhibitorischen Einfluß nehmen (Chuang, T.T. *et al.*, 1996; Pronin, A.N. *et al.*, 1997).

Die Regulierung von GRK durch CSP (ausgenommen GRK1 durch Recoverin) stellt einen *Feedback* Mechanismus dar, der im Rahmen der homologen Desensitierung Rezeptoren moduliert (Iacovelli, L. *et al.*, 1999).

Für eine Reihe von Phosphatasen, die über eine katalytische Domäne am N-Terminus sowie über EF-Handmotive am C-Terminus verfügen, ist die Funktion zur Resensitisierung der durch GRK phosphorylierten Rezeptoren wie für Rhodopsin durch die Protein-Phosphatase RDGC aus *Drosophila* beschrieben (Steele, F.R. *et al*. 1992; Vinos, J. *et al*., 1997; Lee, S.-J & Montell, C., 2001). Diese Klasse von Phosphatasen wird als GRP (*G-protein-coupled receptor phosphatases*) bezeichnet. Auch die Regulierung von Rezeptor-Phosphatasen stellt einen wichtigen Mechanismus dar, um im Rahmen der Resensitisierung die Rezeptorfunktion zu modulieren.

Zielsetzung

Für das gustatorische System von Vertebraten sind Proteine der beschriebenen Funktionen bisher nicht bekannt, die Teil eines „Gustduciosoms“ sind oder zu seiner Ausbildung benötigt werden.

Zur Identifizierung solcher Proteine konnte von Gabriel Frank im Rahmen seiner Diplomarbeit mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems das Calcium- und Integrin-bindende Protein (CIB) als Interaktionspartner für die C-terminale Domäne des T1R2 identifiziert werden.

In dieser Arbeit sollte diese Wechselwirkung weiter charakterisiert und verifiziert werden. Dafür sollten Untersuchungen zur Gewebeexpression des CIB-Proteins sowie biochemische Analysen durchgeführt werden, um eine funktionelle Einstufung des Proteins innerhalb des gustatorischen Systems vornehmen zu können.

Eine Besonderheit der drei Mitglieder der T1R-Familie ist die Heterodimerisierung zur Ausbildung der funktionellen Süß- und Umami-Rezeptoren. Aufgrund des Expressionsmusters von T1R1, -2 und -3 im chemosensorischen Gewebe ist die Existenz eines bisher nicht beschriebenen Rezeptors, der mit dem T1R3 einen Dimer ausbildet, möglich. Dabei konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartwig Schmale ein ähnlicher humaner G-Protein-gekoppelter Rezeptor durch Datenbankanalysen identifiziert und anschließend kloniert werden.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit sollte nach Klonierung des orthologen Rezeptors aus der Ratte, für diesen durch Analysen zur Gewebeexpression sowie durch Untersuchungen zur Dimerisierung mit dem T1R3 eine Einstufung in die Geschmacksrezeptorfamilie T1R erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Oligonukleotide, GenBank-Zugriffsnummern und Plasmidkonstrukte

2.1.1 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 Ethanolfällung wurden diese von zusätzlichen Salzen befreit und auf eine Konzentration von 10 pmol/µl in H_2O eingestellt. Für die Durchführung von Reaktionen zur Mutagenese an Plasmidkonstrukten wurden Oligonukleotide, die am 5'-Ende phosphoryliert waren, bei der Firma MWG BIOTECH AG über die Internetadresse www.mwg-biotech.com bestellt. Diese Oligonukleotide wurden mit H_2O auf die Endkonzentration von 100 ng/µl eingestellt. Alle zur PCR und Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Bezeichnung	**Sequenz 5'→ 3', Verwendungszweck**	**Schnitt -st.**
rCIB,F rCIB,R	ATACCATGGATATGGGAGGTTCGGGCAGT GCTGGATCC**TCA**CAGGACAATCTTAAAGG **Amplifizierung und Klonierung rCIB nt 1 - 576 in pGBKT7**	NcoI BamHI
L/C-rCIB,F	GTACCATGGTGTCACTGCATACCCGAG **Amplifizierung und Klonierung rCIB nt 140 - 576 in pGBKT7**	NcoI
L/N-rCIB,R	ATCGGATCCGAAGCACTGAGCCGAGT **Amplifizierung und Klonierung rCIB nt 1 - 438 in pGBKT7**	BamHI
M-rCIB,F	CATCCATGGACCATTATGCCTTCCGCAT **Amplifizierung und Klonierung rCIB nt 324 - 576 in pGBKT7**	NcoI
M-rCIB,R	GTCGGATCC**TCA**ATGCGGAAGGCATAATG **Amplifizierung und Klonierung rCIB nt 1 - 341 in pGBKT7**	BamHI
rCIBEco,F rCIBBam,R	CACGAATTCCAATGGGAGGTTCGGGCAGTC CATGGATCCCAGGACAATCTTAAAGGAG **Amplifizierung und Klonierung rCIB nt 1 - 576 in p3XFLAG-CMV-14**	EcoRI BamHI
rhCIBC,F rhCIBD,R	CTTCAAGGAGCGAATCTGCA GAGATGACGTGCTGGAACTC **RT-PCR nt 203 - 532**	

TR1A,F TR1B,R	CGGCCCATGGCCAAGTGCTATGTGATTCTC GATGGATCC**TCA**GGTAGTGCCGCAGCGCCTC **Amplifizierung und Klonierung T1R1 nt 2426 - 2523 in pGBKT7**	NcoI BamHI
TR2A,F TR2B,R	GCTGCCATGGCCAAGTGTTACATGATCCTT GATGGATCC**TCA**GCTCTTCCTCATGGTGTA **Amplifizierung und Klonierung rT1R2 nt 2441 - 2532 in pGBKT7**	NcoI BamHI
YrT1R3,F rT1R3,R	GCACCATGGCATGCTATGTACTTCTGTGG AATGGATCC**TCA**TTCACTGTGTCCCCGAGTTG **Amplifizierung und Klonierung rT1R3 nt 2454 - 2577 in pGBKT7**	NcoI BamHI
YrTRX,F YrTRX,R	CGACCATGGCTAAGTGCTACATTATTCTTTG GACGGATCC**TCA**TATACTTGAACTTCTTTTC **Amplifizierung und Klonierung rTRX nt 2503 - 2787 in pGBKT7**	NcoI BamHI
P-T1R2ctR$_{825}$→L,F rT1R2ctM$_{818}$→V,F rT1R2ctM$_{840}$→R,R	*CCGGAGCTCAACACCTCAGCCTATTTC GCTGCCATGGCCAAGTGTTACGTGATCCTTTTC GATGGATCC**TCA**GCTCTTCCTCCGGGTGTAGCCC **Amplifizierung und Mutagenese des rT1R2 nt 2441 - 2532 in pGBKT7**	NcoI BamHI
P-rT1R2M$_{818}$→V,F	*GGCCAAGTGTTACGTGATCCTTTTCTAC **Mutagenese des rT1R2-FLAG in pcDNA5FRT**	
rTRX1,F	TCCACGTCTTCAATCTCTTC ***Nested* PCR nach 3'-RACE, RT-PCR-Untersuchungen**	
rTRX2,R rTRX3,F	GCACAGCAAGCTGAATGCTG GGAATTCGC**ATG**GCCCTATCATTTGTATTTA **Amplifizierung und Klonierung von rTRX nt 1 - 1260 in pCR-BluntII-TOPO**	EcoRI
rTRX4,F	GAGGATGCTGAATTTACAGCTCATGCC **RT-PCR-Untersuchungen**	
rTRX5,F	CGAACCGTGCCCAGTGACTTCTACC **3'-RACE**	
rTRX6,F	GCATTATACTGAGCCAGGAC **Sequenzierung**	
rTRX7,F rTRX8,R	GCCAATTGCAG**ATG**GCCCTATCATTTGTA GAGCGGCCGCGTATACTTGAACTTCTTTTC **Amplifizierung und Klonierung rTRX nt 1- 2784 in pcDNA3**	MfeI NotI
rTRX9,F rTRX10,R	CGAGAAGGAAGTGGAGTATCTTG CTTGCCGAAAGTGGTAGCATA **Sequenzierung, RT-PCR-Untersuchungen**	

mTRX1,F mTRX2,R	ATGCTGAACTTACAGCTCATG T T GTCTCGAGCTTGGCACAGATC A A **Amplifizierung der rTRX Sequenz nt 472 - 1302**	
rTRX3'-UTR,F	GGCTATGATTCCCCAATAAG **Sequenzierung der 3'-UTR von rTRX**	
TR1A/H,F	CGGCAAGCTTAAGTGCTATGTGATTCTCTG **Amplifizierung und Klonierung rT1R1 nt 2426 - 2523 in pinpointXa-3**	HindIII
TR2A/H,F	GCTGAAGCTTAAGTGTTACATGATCATTTT **Amplifizierung und Klonierung rT1R2 nt 2441 - 2532 in pinpointXa-3**	HindIII
pPPXa/bio,F pPPXa/bio,R	GCGCTGCAGAACCATTCCATT AGCGGATCC**TCA**ATGAAGCTTTTC **Amplifizierung und Klonierung des ppXa-P (*biotin purification tag*) aus pinpointXa-3 in pSP64PolyA**	PstI BamHI
rT1R1/pEGFP,F	GAACTCGAGCCAAGTGCTATGTGATTCTC **Amplifizierung und Klonierung rT1R1 nt 2426 - 2523 in pEGFP-N2**	XhoI
rT1R2/pEGFP,F	GCACTCGAGCGAAGTGTTACATGATCCTT **Amplifizierung und Klonierung rT1R2 nt 2441 - 2532 in pEGFP-N2**	XhoI
rhActI,F rhActII,R	ATGGATGATGATATCGCTG C C ATGAGGTAGTCTGTCAGGTC A **RT-PCR Untersuchungen**	
rhHGPRTf,F rhHGPRT2r,R	CGTCGTGATTAGTGATGATG TTCAAATCCAACAAAGTCTGGC RT-PCR Untersuchungen	
pGEX-Seq	TCCAGCAAGTATATAGC **Sequenzierprimer für pGEX-2T (liegt bei 840-856bp)**	
rT1R2/TMD,F	GATCCATGGTCAACTTCCTGGCCATCGGCTT **Sequenzierung des 3'-Endes von rT1R2**	NcoI

Tab. 1: 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 Biotech AG. Die nt-Angaben beziehen sich auf die jeweilige codierende Sequenz.

2.1.2 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.

Sequenz	Spezies	GenBank-Nummer
Calcium Integrin bindendes Protein	Ratte	AF136585
T1R1	Ratte	AF127389
T1R2	Ratte	AF127390
T1R3	Ratte	AF456324
TRX	Ratte	AJ535460 (n.v.)
Gustducin	Ratte	XM_216070

Tab. 2: Nukleotidsequenz und GenBank-Zugriffsnummern
Angegeben sind die in dieser Arbeit eingesetzten Sequenzen, die Spezies und die GenBank-Zugriffsnummer. n.v.: nicht veröffentlicht

2.1.3 Zur Verfügung gestellte Plasmide

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

Ausgangsvektor	Herkunft	Beschreibung
pGBKT7	Clontech	Köder-Plasmid im Hefe Zwei-Hybrid-System mit GAL4 DNA-Bindedomäne
pGADT7	Clontech	Bibliotheks-Plasmid im Hefe Zwei-Hybrid-System mit GAL4 Aktivierungsdomäne
pGEX2T	Amersham Pharmacia	Herstellung von Gluthation-S-Transferase (GST) Fusionsproteinen im prokaryontischen System
pPinPoint-Xa3	Promega	Herstellung rekombinant exprimierter Fusionsproteine mit einem in Bakterien biotinyliertem 13 kDa großen Peptid (ppXa-P)
pBluescriptKS	Stratagene	*in vitro* Transkription Digoxigenin markierter Sonden
pSP64-PolyA	Promega	Herstellung von Poly-A^+-Transkripten *in vitro*
pEGFP-N2	Clontech	Expression von Fusionsproteinen mit dem N-terminalem Grün-fluoreszierenden Protein (EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) in eukaryontischen Zellen
pCMVtag2B	Stratagene	Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen, an denen am N-Terminus ein Peptid bestehend aus den Aminosäuren MDYKDDDDK, dem sogenannten FLAG-*tag*, fusioniert ist
p3xFLAG-CMV-14	Sigma	Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen, an denen am C-Terminus ein FLAG-*tag* (3X) fusioniert ist

pcDNA5/FRT	Invitrogen	Generierung stabiler isogener Zelllinien durch Rekombinase vermittelte Integration an einem spezifischen Lokus in das Genom
pCR2.1-TOPO	Invitrogen	Klonierung von *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten
pCR-BluntII-TOPO	Invitrogen	Klonierung von *Pfu*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten
pGEX-JDK,		Rekombinante Expression der GST versehen mit einem C-terminalem Myc-*tag*, erhalten von Dr. Dietmar Kuhl, ZMNH, UKE, Hamburg
rCIB-HA-pGEX-JDK,		Rekombinante Expression des GST-rCIB-HA-Fusionsproteins, erhalten von Dr. Dietmar Kuhl, ZMNH, UKE, Hamburg
rT1R2-FLAG-pcDNA5/FRT		Herstellung einer rT1R2 stabil exprimierenden Zellline durch das Flp-In™-System, erhalten von Prof. Dr. Wolfang Meyerhof (DIfE, Potsdam)

Tab 3: Kommerziell erhältliche Vektoren und zur Verfügung gestellte Plasmide
Aufgelistet sind die Bezeichnung, die Herkunft sowie der Einsatzbereich.

2.1.4 Konstruierte Plasmide

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Bezeichnung	**Sequenzbereich der Insertion**	**Verwendungszweck**
rT1R1ct-pGBKT7	rT1R1 nt 2426 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2532	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R3ct-pGBKT7	rT1R3 nt 2454 - 2577	Hefe Zwei-Hybrid-System
rTRXct-pGBKT7	rTRX nt 2503 - 2787	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct$_{M\rightarrow V}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct$_{R\rightarrow L}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct$_{M\rightarrow R}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct$_{M\rightarrow V,M\rightarrow R}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct$_{M\rightarrow V,R\rightarrow L}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct $_{R\rightarrow L,M\rightarrow R}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
rT1R2ct$_{M\rightarrow V,R\rightarrow L,M\rightarrow R}$-pGBKT7	rT1R2 nt 2441 - 2523	Hefe Zwei-Hybrid-System
ppXa-P-rT1R1ct-pSP64	ppXa-P nt 1 - 386, rT1R1 nt 2428 - 2523	*in vitro* Transkription
ppXa-P-rT1R2ct-pSP64	ppXa-P nt 1-386, rT1R2 nt 2443 - 2523	*in vitro* Transkription
ppXa-P-pSP64	ppXa-P nt 1 - 386	*in vitro* Transkription

rT1R1ct-pEGFP	rT1R1 nt 2428 - 2523	Expression in eukaryontischen Zellen
rT1R2ct-pEGFP	rT1R2 nt 2443 - 2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rT1R2-FLAG-pcDNA5/FRT	rT1R2 nt 1 - 2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rTRX-FLAG pcDNA5/FRT	rTRX nt 1 - 2787	Expression in eukaryontischen Zellen
rT1R2M→V-pcDNA5	rT1R2 nt 1 - 2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rT1R2-HSV-pcDNA3	rT1R2 nt 1 - 2532	Expression in eukaryontischen Zellen
rT1R3-FLAG-pcDNA3	rT1R3 nt 1 - 2577	Expression in eukaryontischen Zellen
rTRX-HSV-pcDNA3	rTRX nt 1 - 2787	Expression in eukaryontischen Zellen
rT1R3NL-pBSKS	rT1R3 nt 1 - 840	*In vitro* Transkription
rTRXNL-pBSKS	rTRX nt 1- 960	*In vitro* Transkription
rCIB-HA-pGEX	rCIB nt 1 - 576	Expression in Bakterien
rCIB-pGBKT7	rCIB nt 1 - 576	Hefe Zwei-Hybrid-System
rCIB-pGADT7	rCIB nt 1 - 576	Hefe Zwei-Hybrid-System
C/rCIB-pGADT7	rCIB nt 325 - 576	Hefe Zwei-Hybrid-System
L-C/rCIB-pGADT7	rCIB nt 141 - 576	Hefe Zwei-Hybrid-System
N/rCIB-pGADT7	rCIB nt 1 - 341	Hefe Zwei-Hybrid-System
L-N/rCIB-pGADT7	rCIB nt 1 - 440	Hefe Zwei-Hybrid-System
FLAG-rCIB-pCMV	rCIB nt 1- 576	Expression in eukaryontischen Zellen
rCIB-FLAG-p3xFLAG-CMV-14	rCIB nt 1- 576	Expression in eukaryontischen Zellen

Tab. 4: Konstruierte Plasmide
Aufgelistet sind die Bezeichnung, der enthaltene Sequenzbereich, wobei sich die nt-Angaben auf die codierende Sequenz beziehen, und der Verwendungszweck.

2.2 Antikörper/ Protein-A-Agarose

Die in dieser Arbeit verwendeten primären und sekundären Antikörper sind mit Angabe der Herkunft in Tabelle 5 angegeben.

Antikörper (Spezies)	Verwendung (eingesetzte Verdünnung)	Herkunft
α-EGFP, polyklonal (Kaninchen)	Western Blot (1:1000)	Clontech
α-FLAG M2, monoklonal	Western Blot (1:2000), Immuncytochemie (1:1000)	Stratagene
α-T7, monoklonal	Western Blot (1:5000), Immuncytochemie (1:1000)	Novagen
α-$G_{\alpha gust}$, polyklonal (Kaninchen)	Immunhistochemie (1:100)	Santa Cruz
α-hCIB, monoklonal	Immunhistochemie (1:100)	Dr. U.P. Naik, North Carolina (Naik, U.P. *et al.*, 1997)
α-hGolgin-97, monoklonal	Immuncytochemie (1:500)	Molecular Probes
α-Dig-Antikörper, AP-gekoppelt	*in situ*-Hybridisierung (1:500)	Enzo
α-HSV, monoklonal	Western Blot (1:10000), Immuncytochemie (1:5000)	Novagen
α-Kaninchen IgG-HRP (Ziege)	Western Blot (1:2000)	Amersham Pharmacia
α-Maus IgG-HRP (Ziege)	Western Blot (1:2000)	Amersham Pharmacia
α-Kaninchen IgG-Alexa® Fluor 488 (woher)	Immuncytochemie (1:1000)	Molecular Probes
α-Maus IgG-Cy3 (Ziege)	Immuncytochemie (1:1000)	Dianova
α-Kaninchen IgG-biotin (Schwein)	Immunhistochemie (1:250)	DAKO
α-Maus IgG-biotin (Kaninchen)	Immunhistochemie (1:250)	DAKO
Maus-PAP	Immunhistochemie (1:100)	DAKO
Kaninchen-PAP	Immunhistochemie (1:100)	DAKO
IgG, Kaninchen	Co-Immunopräzipitation	Sigma
Protein A-Agarose	Co-Immunopräzipitation	Santa Cruz Biotechnology
EZ-view Red α-FLAG M2 Affinity Gel	Co-Immunopräzipitation	Sigma

Tab. 5: Verwendete Antikörper
Angegeben sind die Bezeichnung, der Verwendungszweck und die entsprechend eingesetzte Verdünnung sowie die Herkunft.

2.3 Bakterienstämme, Hefestämme, Zelllinien und Tiere

Bakterienstämme

Die eingesetzten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Stamm	Genotyp	Herkunft
E.coli XL1blue	RecA1 endA1 gyrA96 Tho-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F´proAB $lacI^q$ ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]	Stratagene
E.coli M15 [pREP4]	Nal^S Str^S Rif^S Thi^- Lac^- Ara^+ Gal^+ Mtl^- F^- $RecA^+$ Uvr^+ Lon^+	Qiagen
E.coli XL10-Gold	Tet^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB $laqI^q$ZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]	Stratagene
E.coli TOP10	F^- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rspL (Str^R) endA1 nupG	Invitrogen

Tab. 6: Verwendete Bakterienstämme
Angegeben sind die Bezeichnung des Stammes, der zugehörige Genotyp und die Bezugsquelle.

Hefestamm

Für Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe Zwei-Hybrid-System wurde der Hefestamm AH109 (Clontech), der die Reportergene HIS3, ADE2 und lacZ unter der Kontrolle des GAL4-Promoters trägt, verwendet.

Zelllinien

HEK293 (Humane embryonale Nierenzellen)	DMSZ- (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Nr.: ACC 305
Flp-In™-293	Invitrogen

Tiere

Zur Gewebeentnahme wurden Wistar-Ratten der Gattung *Rattus norvegicus* aus der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.4 DNA: Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden mit den gewünschten Restriktionsenzymen nach den von den Herstellern empfohlenen Reaktionsbedingungen (Invitrogen Life Technologies, MBI Fermentas, New England Biolabs, Roche) geschnitten. Die Enzymreaktionen wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin, 20% Tris-HCl, pH 8,0) gestoppt.

2.4.2 DNA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer spezifischen Länge zur Analyse von DNA-Präparationen, Restriktionsverdaus, PCR-Produkten und zur Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelkammern (Serva). Die Agarose (Invitrogen Life Technologies) wurde je nach erwarteter Fragmentlänge als 0,5-2%ige Lösung [w/v] in 1x TAE-Puffer (Sambrook, J. *et al.*, 1989) gelöst und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Die Gel-Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines 356 nm-UV-Leuchttisches (UVT-28M, Herolab) und einem Videokamera-gesteuerten Drucker (Mitsubishi).

2.4.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Nach der Amplifizierung einzelner PCR-Produkte konnte für eine anschließende Reaktion mit Restriktionsendonukleasen das DNA-Fragment durch das *QIAquick PCR-Purification Kit* (Qiagen) von Reaktionskomponenten der PCR getrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers.

2.4.4 DNA-Extraktion nach präparativer Agarosegelelektrophorese

Nach der Gelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Fragmente mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen) erfolgte die Isolierung der DNA aus der Agarose nach Herstellerangaben. Die DNA wurde von den eingesetzten Säulen mit 30 µl auf 55°C vorgewärmtem H_2O eluiert. Nach der Aufreinigung wurde 1 µl des Eluates auf ein Agarosegel aufgetragen und mittels eines DNA Längenstandards die Größe und Konzentration überprüft.

2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Eine Menge von 10-30 fmol Vektor-DNA wurde mit der dreifachen molaren Menge an Fragment-DNA durch 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen Life Technologies) für 2 - 4 h bei

RT oder bei 16°C ü.N. ligiert. PCR Produkte mit 3'-A-Überhängen wurden in den pCR2.1-TOPO (Invitrogen) und PCR-Produkte ohne überhängende Enden nach Amplifizierung mit der *Pfu*-Polymerase in den pCR Blunt II-Vektor (Invitrogen) kloniert.

2.4.6 Transformation von Bakterien

Zwanzig µl kompetente *Escherichia coli* XL1-Blue SUBCLONING GRADE oder SUPERCOMPETENT Zellen (Stratagene) wurden mit 1 - 2 µl eines Ligationsansatzes oder mit 50 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 45 sec Hitzeschock bei 42°C wurden 500 µl LB-Medium hinzugefügt und es folgten 30-60 min Inkubation bei 37°C unter Schütteln. Die Zellen wurden sedimentiert (4000x g, 2 min), in 200 µl LB-Medium aufgenommen und auf Selektionsplatten ausgestrichen (Sambrook, J. *et al*. 1998). Die Inkubation der LB-Platten erfolgte ü.N. bei 37°C.
Für Ligationsansätze mit TOPO-Vektoren wurden die für dieses System optimierten TOP10 Zellen (Invitrogen) verwendet.

2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

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 *JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit* (Genomed) gemäß den Herstellerangaben. Die Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus 50 – 600 ml entsprechend hergestellten Bakteriensuspensionen erfolgte mit dem *QIAGEN Plasmid Midi Kit* oder *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen).

2.4.8 Automatische DNA Sequenzierung

Die automatische Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte nach der Didesoxy-Methode von Sanger, F. *et al*. (1977). Die Sequenzierreaktion wurde mit Hilfe des *ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* (Applied Biosystems) im Servicelabor des IZKNs durchgeführt. Die Analyse der fluoreszenzmarkierten Fragmente erfolgte auf dem Modell ABI Prism 377 DNA Sequenzer (Applied Biosystems). Zur Sequenzierung wurden 500 ng über Säulen (Genomed) aufgereinigte DNA eingesetzt.

2.4.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung gewünschter DNA erfolgte durch den *PCR-Cycler* Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer), 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, 0,2 µM je Oligonukleotid, 200 µM dNTPs, 5 µl 10x Puffer (Herstellerangaben zur *Pfu*-DNA-Polymerase), 2,5-3,5 mM $MgCl_2$, 2-5 U *Pfu*-DNA-Polymerase und H_2O ad 50 µl. 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 sec	25 - 35 Zyklen
Primer-Anlagerung	55-65°C	30 sec	
Polymerase Reaktion	72°C	30 sec – 4 min	
abschl. Polymerase Reaktion	72°C	7 – 10 min	1

2.4.10 *3'-RACE*

Zur Amplifizierung von 3'-Enden unbekannter cDNA-Sequenzen eines gewünschten Gens wurde das *SMART™ RACE cDNA Amplification Kit* von CLONTECH eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für die *RACE*-Reaktion wurde der *Advantage 2 Polymerase Mix* (Clontech) verwendet. Zur Addition von 3'-A-Überhängen wurde das PCR-Produkt mit 2,5 U *Taq*-Polymerase für 15 min bei 72°C inkubiert, um eine anschließende Klonierung in den pCR2.1-TOPO zu ermöglichen.

2.4.11 Zielgerichtete Mutagenese

Um die Beziehung von Struktur und Funktion eines Proteins zu untersuchen, wurden gezielte Austausche von Aminosäuren vorgenommen. Hierzu wurden mit Hilfe des *QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) Insertsequenzen unter Verwendung von Oligonukleotiden mit den gewünschten Codons modifiziert. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Nach Restriktionsverdau mit DpnI zur Eliminierung der cDNA-Matrize wurden die XL10-Gold® Zellen mit der die Mutation tragenden zirkulären ssDNA transformiert.

2.4.12 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten mit ^{32}P

Die Markierung von cDNA-Fragmenten mit [$\alpha^{32}P$]dCTP (3000Ci/mmol, 10µCi/µl, Amersham-Pharmacia) wurde mit dem *Prime It® II Random Primer Labeling Kit* (Stratagene) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide

wurden durch Gelfiltration mit *NucTrapProbe Purification Columns* (50) (Stratagene) entfernt. Nach Überprüfung des radioaktiven Einbaus durch Bestimmung der Zählrate im Flüssigkeits-Szintillationscounter *Wallac* 1409 (Wallac) (spezifische Aktivität > 1x 10^9 dpm/µg) wurden die markierten Fragmente zur Hybridisierung von Northern Blots eingesetzt.

2.5 RNA: Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Nothern Blot Hybridisierung

Northern Blots wurden nach Anfeuchten für 2 min mit 2x SSC in einem Hybridisierröhrchen (Schott) mit 10 ml auf 68°C vorgewärmter Hybridisierlösung (ULTRAhyb™, Ambion) für 30 min bei 42°C unter Rotieren prähybridisiert. Die Hybridisierung mit 106 cpm [α^{32}P]dCTP/ml markierter DNA erfolgte in Hybridisierlösung ü.N. bei 42°C. Unspezifisch gebundene Sonde wurde durch zweimaliges Waschen des Blots für 5 min in 2x SSC + 0,1% SDS und für 2x 15 min in 0,1x SSC + 0,1% SDS bei 42 °C entfernt. Nach Belichtung einer für [^{32}P] sensitiven Phosphoimager-Platte wurde diese im *Fujifilm BAS-1800II reader* (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ausgelesen. Dadurch konnte spezifisch gebundene Sonde über die radioaktive Markierung detektiert werden.

2.5.2 Gewinnung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Die Extraktion von Gesamt-RNA aus enzymatisch präparierten Circumvallaten Papillen der Ratte erfolgte mit Hilfe der *RNAClean™ Solution* (Hybaid) nach Protokoll des Herstellers. Hierfür wurde das Gewebe mit dem 20-fachen Volumen [v/w] an *RNAClean™ Solution* versetzt und mit Hilfe eines Potters homogenisiert. Nach Zugabe von 1/10 Volumen an Chloroform und einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000x g bei 4°C die obere wässrige Phase abgenommen, aus der durch Zugabe einer äquivalenten Menge Isopropanol die RNA gefällt wurde. Die mit 80%igem Ethanol gewaschene RNA wurde Luft getrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen.

2.5.3 Präparation von Geschmacksepithel zur RNA-Gewinnung

Die Isolierung von Geschmackspapillen aus Rattenzungen erfolgte in Anlehnung an Spielman & Brand (1995) unter Zuhilfenahme eines Präparier-Binokulars 6.5-40 (Leitz). Eine Enzymlösung aus 0,5 mg/ml Kollagenase A (Boehringer), 1 mg/ml Trypsininhibitor (Sigma), 2,5 U Dispase II (Boehringer) in 1x HBS (140 mM NaCl, 20 mM KCl, 10 mM

Hepes, pH 7,4, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$) wurde mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze und einer Kanüle (0,40 x 20) zwischen Zungenepithel und der darunterliegenden Dermis injiziert. Einstiche zur Injektion wurden kreisförmig um circumvallate Papille und foliate Papille und an der Zungenspitze vorgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min in HBS -Ca^{2+}, das anstelle des Calciums 2 mM EGTA enthält, konnte das Epithel einschließlich der darin eingebetteten Geschmackspapillen von der Zunge separiert werden. Die Entfernung von restlichem Drüsengewebe und Zungenepithel erfolgte in HBS -Ca^{2+}.
Geschmacksstreifen und Geruchsepithel wurden mit einem Skalpell von angrenzendem Gewebe abgetrennt.

2.5.4 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 2.1.1), wobei je 5 µl der 1:10 verdünnten cDNA eingesetzt wurden.

2.5.5 Präparation von Rattenzungen zur Herstellung von Gewebeschnitten

Adulte Ratten wurden mit CO_2 betäubt und dekapitiert. Der am Gaumen befindliche Geschmacksstreifen sowie die am Zungengrund gelegene circumvallate Papille wurden herausgeschnitten und auf Trockeneis in Tissue Tek (OCT COMPOUND) eingefroren. Bis zur Herstellung der Schnitte wurde das Gewebe bei -70°C gelagert. Die 10-15 µm Schnitte wurden bei -20°C im Kryostaten (JUNG CM 3000, Leica) angefertigt, auf beschichtete Objektträger (SUPERFROST PLUS, Roth) aufgebracht und anschließend bei -70°C gelagert.

2.5.6 Herstellung Digoxigenin markierter RNA-Sonden

Zur *in vitro* Transkription von RNA-Sonden wurden 300 ng PCR-Produkt, 1,5 µl 10x Transkriptionspuffer (Boehringer), 0,5 µl RNasin (Promega), 1,5 µl 10x *DIG RNA Labeling MIX* (Enzo), 1,5 µl RNA-Polymerase (T7- oder T3-RNA-Polymerase, Roche) und H_2O ad 15 µl zusammen pipettiert, für 2 h bei 37°C inkubiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Vor dem Einsatz zur Hybridisierung wurden die Sonden für 10 min bei 85°C aufgeschmolzen.

2.5.7 *In situ* Hybridisierung an Dünnschnitten des Geschmacksstreifens und der circumvallaten Papille

Gewebeschnitte des Geschmacksstreifens wurden 10 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Nach kurzem zweimaligem Waschen in PBS, anschließender 10-minütiger Inkubation in 0,2 N HCl, wurden die Schnitte zur Permeabilisierung für 2 min in 1% TritonX-100 in PBS inkubiert. Eine Acetylierung erfolgte, indem die Schnitte in 0,1 M Triethanolamin, pH 7-8 (mit HCl eingestellt) gelegt wurden und innerhalb 10 min Acetanhydrid tropfenweise unter stetigem Rühren zugegeben wurde. Nach 2x waschen mit PBS erfolgte die Prähybridisierung mit 300 µl pro Objektträger Hybridisierlösung (5x SSC, 5x Denhardt, 250 µg/µl Hefe tRNA, 500 µl Heringssperm DNA, 50% Formamid und 0,1% Tween20) für 2 h bei RT in einer feuchten Kammer. Die Hybridisierung mit Digoxigenin markierter RNA mit einer Endkonzentration 200 ng/ml erfolgte bei 60°C ü.N. in einer feuchten Kammer. Nach 1x 2-minütigem Waschen bei RT und 1x 30-minütigem Waschen bei 60°C mit jeweils 5x SSC und 2x mit 0,2x SSC für 30 min bei 60 °C erfolgte die immunologische Detektion der Digoxigenin markierten RNA. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit 500 µl *Blocking* Reagenz (Boehringer) für 60 min bei RT inkubiert. Die Inkubation des mit Alkalischer Phophatase gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörpers (Enzo) in einer 1:2000 Verdünnung erfolgte ü.N. bei 4°C. Nach 3x 1-minütigem Waschen mit B1-Lösung (0,1 M Maleinsäure, pH 7,5, 0,15 M NaCl) und einer 5-minütigen Äquilibrierung in B3-Lösung (100mM Tris-HCl, pH 9,5, 100mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$) erfolgte die Detektion über BCIP/NBT-Lösung (0,45% v/v NBT-Lösung [Nitroblautetrazolium, Boehringer] und 0,35% v/v BCIP-Lösung [5-Bromo-4-chloro-indolylphosphat, Roche] in 100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCL, pH 9,5) im Dunkeln bei RT. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop verfolgt und je nach Farbentwicklung die Reaktion nach 2-24 h abgestoppt.

2.6 Protein: Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Je nach Proteingröße wurden 10-15%ige SDS-Polyacrylamidgele (Sambrook, J. *et al.*, 1989) zur Auftrennung von Proteinen eingesetzt. Pro Gelspur wurden 20-30 µl Proteinextrakt, der mit 5x Probenpuffer (Laemmli, U.K. *et al.*, 1970) versetzt und zur Denaturierung und Spaltung von Disulfidbrücken für 5 min aufgekocht wurde, aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer (3 g Tris base, 14,4 g Glycin, 10 ml 10% [w/v] SDS pro Liter) für 1-2 h bei 160 V in einer Gel Apparatur

(MINI PROTEAN II, BioRad). Der vorgefärbte Molekulargewichtsstandard Benchmark-Marker (GibcoBRL) diente der Größenabschätzung.

2.6.2 Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Nach SDS-PAGE wurden Gele in Coomassie-Lösung (0,25% [w/v] Coomassie Brilliant Blue R 250, 0,05% [w/v] Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% Methanol, 10% v/v Eisessig) für 20 min bei RT gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung (50% [v/v] Methanol, 10% [v/v] Eisessig) entfärbt, in H_2O gewaschen und getrocknet (*GelAir Dryer*, BioRad).

2.6.3 Elektrotransfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)

Zur immunologischen Detektion von Proteinen wurden diese nach SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose Membran (Schleicher&Schuell) übertragen. Der Proteintransfer erfolgte in Blotpuffer (38 mM Glycin, 47 mM Tris base, 0,03% [v/w] SDS, 20% [v/v] Methanol) je nach Proteingröße für 1-2 h in einer Blot Apparatur (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, BioRad) bei 100 $V_{const.}$ und 4°C.

2.6.4 Immunologische Detektion von Proteinen auf NC-Membranen

Nach dem Proteintransfer wurde der Western Blot für 1 h in Blockierlösung (4% [w/v] Magermilchpulver in PBS) bei RT blockiert. Die Inkubation des primären Antikörpers verdünnt in Blockierlösung im Verhältnis 1:500 bis 1:10 000 erfolgte ü.N. bei 4°C. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit PBS wurde der Western Blot mit HRP-gekoppeltem sekundären Antikörper in einer 1:2000 Verdünnung in Blockierlösung für 1-2 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei 10-minütigen Waschschritten mit PBS erfolgte die Detektion der an die Proteine gebundenen Antikörper mit Hilfe des ECL-Reagenzes (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech) nach Vorschrift des Herstellers auf Röntgenfilmen (CRONEX MEDICAL X-RAY Film, Agfa).

2.6.5 Expression und Aufreinigung rekombinant exprimierter Fusionsproteine

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen wurde das *GST Gene Fusion Expression System* (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. *E. coli* M15 Zellen, die entsprechende Expressionsvektoren trugen, wurden in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C unter Schütteln ü.N. inkubiert. Diese Vorkultur wurde auf OD_{600} = 0,1 verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase von OD_{600} = 0,6 - 0,7 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde dann durch 1 mM IPTG (*Isopropyl-b-D-Thiogalactopyranoside*, Roth) induziert. Nach 3-stündiger Induktionsphase wurden die

Zellen sedimentiert (5000x g, 10 min, 4°C), in eiskaltem STE-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0. 1 mM EDTA) gewaschen und das Bakterienpellet eingefroren. Zur Zelllyse cytosolischer Fusionsproteine wurde das Bakterienpellet auf Eis mit 10 ml STE-Puffer resuspendiert, mit *Protease-Inhibitor Cocktail* (COMPLETE™, Roche) und 100 µl Lysozym (10 mg/ml) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Ultraschallbehandlung (5x jeweils 5 sec auf Eis; Stufe 5, SONIFIER B-12) wurde das Bakterienlysat 30 min bei 4°C und 13 000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml in PBS äquilibrierter Glutathion Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech AG) auf Chromatographie Säulen (*Poly-Prep® Chromatography Columns*, BIO-RAD) gegeben und für 2 h bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Säulen-Matrix mit PBS wurden die aufgereinigten Fusionsproteine dreimal mit je 1 ml 10 mM reduziertem Glutathion in PBS eluiert.

2.6.6 Dialyse

Aufgereinigte, mit Glutathion eluierte GST-Fusionsproteine wurden mit *VISKING*-Dialysierschläuchen (SERVA) mit einem mittleren Porenradius von 24 Å gegen PBS mit 0,1% TritonX-100 dialysiert. Die Vorbehandlung der Dialysierschläuche mit 2% Natriumbicarbonat und 1 mM EDTA, pH 8,0, erfolgte nach Anleitung von Sambrook, J. *et al.*, 1989.

2.6.7 *In vitro* Translation von Proteinen

Zur *in vitro* Translation von Proteinen wurde das *TNT™ Coupled Reticulocyte Lysate System* (Promega) verwendet, bei dem Transkription mit Hilfe des SP6 bzw. T7 Promoters und Translation in einem Reaktionsansatz stattfinden. Die Durchführung erfolgte im halben Ansatz nach Protokoll des Herstellers, wobei durch den Einbau von [^{35}S] Methionin (1000 Ci/mmol, 10 µCi/µl, Amersham Pharmacia Biotech) während der Translation die Proteine radioaktiv markiert wurden.

Zur Analyse wurden 2 µl der Translationsprodukte auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach Gelelektrophorese wurde das Gel auf Whatman 3MM Papier für 2 h im Geltrockner bei 80°C getrocknet. Nach Exposition auf einer für [^{35}S] sensitiven Phosphimager-Platte ü.N. wurde diese im *Fujifilm BAS-1800II reader* (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ausgelesen. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit dem Softwareprogramm AIDA Version 2.1 (Bildauswertungs-Software, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH)

2.6.8 GST-*Pulldown Assay*

Zur *in vitro* Untersuchung einer direkten Interaktion zweier Proteine wurde ein *GST-Pulldown Assay* durchgeführt. In 400 µl Bindepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM EGTA, 0,1% BSA, 0,1% TritonX-100, *Protease-Inhibitor Cocktail* (COMPLETE™, Roche)) wurden 150 µg aufgereinigtes und dialysiertes GST-Fusionsprotein oder GST mit 2 µl *in vitro* translatiertem Protein auf dem Rotator bei 4°C inkubiert. Nach 2 h wurden zu den Ansätzen 20 µl mit 0,5% BSA in PBS abgesättigte Glutathion Sepharose zugegeben und für weitere 2 h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Der Sepharose-Protein Komplex wurde nach dreimaligem Waschen mit 1% TritonX-100 in PBS in 40 µl Probenpuffer (Laemmli, U.K. *et al.*, 1970) aufgekocht. Zur Analyse wurden jeweils 10 µl der Ansätze auf zwei 15%ige SDS-Gele aufgetragen, wobei nach PAGE ein Gel zur Detektion der *in vitro* translatierten Proteine getrocknet und mit Hilfe des Phosphoimager Systems ausgewertet wurde. Das zweite Gel wurde zur Visualisierung der GST und des GST-Fusionsproteins mit Coomassie gefärbt.

2.6.9 Immunhistochemie auf Gewebeschnitten der circumvallaten Papille

Die Detektion endogener Proteine auf Gewebeschnitten erfolgte mit einer Enzym-Immunkomplex-Methode, bei der die PAP-Methode (Peroxidase - Anti-Peroxidase-Antikörper - Peroxidase) und die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Enzymkomplex) kombiniert wurden.

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden zunächst entparaffiniert, indem sie für 3x 5 min in Xylolersatz und für 5 min in 100% Ethanol inkubiert wurden. Wurde für die Detektion ein primärer polyklonaler Antikörper aus Kaninchen eingesetzt, wurde durch die Inkubation für 30 min in 1,2% H_2O_2 in Methanol [v/v] die Aktivität der endogenen Peroxidase inhibiert. Bei der Verwendung eines monoklonalen Primärantikörpers wurde dieser Schritt übersprungen, da dies zu Hintergrundfärbung führt. Zur Wässerung wurden die Gewebeschnitte für je 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe in 96%, 80% und 70% Ethanol inkubiert. Nach 5 min in H_2O wurden diese für 15 min in PBS aufbewahrt. Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte für 30 min mit 2% Serum in PBS [v/v] blockiert, wobei für einen monoklonalen Primärantikörper ein sekundärer Antikörper aus Kaninchen eingesetzt wurde und somit zum Blockieren NRS *(normal rabbit serum*) eingesetzt wurde. Für polyklonale Primärantikörper aus Kaninchen wurde ein Sekundärer Antikörper aus Schwein verwendet und somit NSS (*normal swine serum*) zum Blockieren benutzt. Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in entsprechender Verdünnung in PBS mit 0,2% BSA [w/v] und 0,1% NaN_3 [w/v]. Nach 3x waschen mit

PBS für jeweils 10 min wurde ein biotinylierter sekundärer Antikörper für 1 h bei RT inkubiert. Nach 2x 10-minütigem Waschen wurde der PAP-Komplex, der aus der selben Spezies wie der primäre Antikörper stammt, zur Anlagerung an den sekundären Antikörper, der auch als „Brückenantikörper“ bezeichnet wird, für 30 min inkubiert. Nach 2x 10 min waschen wurde ein ABC-Komplex für 30 min inkubiert, der über Avidin an das Biotin des sekundären Antikörpers bindet. Nach je einem 10-minütigem Waschschritt mit PBS und 0,1 M PB, pH 7,4 wurde die Entwicklung der Peroxidaseaktivität durch Zugabe von 15 µl Glucose-Oxidase [1,2 mg/ml], 90 µl [10%ige v/v Glucose], 90 µl Nickelsulfat [0,05 M], 100 µl Ammoniumchlorid [18 mg/100 µl], 100 µl DAB [22,5 mg/ml] in 4,5 ml PB, pH7,4 gestartet. Nach 3x Spülen mit PBS wurden die Gewebeschnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in Eukitt (NOVOGLAS) eingedeckt.

2.7 Zellkultur: Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.7.1 Kultivierung von HEK293-Zellen

Die Zellen der humanen Zelllinie HEK293 (Graham *et al.*, 1977) wurden in *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10% v/v inakiviertem fötalen Kälberserum (FCS, Biother) und 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Hefa) in Zellkultur-Plastikschalen bei 37°C und 5% CO_2 in einem Brutschrank kultiviert. Zum Passagieren konfluenter Zellen wurden diese nach 1x Waschen mit PBS in 0,25% Trypsin (Life Technologies) in PBS für einige Minuten bis zum Ablösen der Zellen von der Schale im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin wurde durch Zugabe von 1 Volumen DMEM inaktiviert und die Zellsuspension für 1 min bei 170x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen, vereinzelt und in einer 5-10-fachen Verdünnung auf neue Kulturgefäße ausplattiert.

2.7.2 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Sechzehn Stunden vor der Transfektion wurden HEK293-Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer auf 2,5x 10^6 Zellen für 10 cm Ø oder 1,5x 10^5 Zellen für 3 cm Ø Gewebekulturschalen verdünnt, um am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 60% erreicht zu haben.

Die Transfektion von HEK293-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook, J *et al.* (1989). Dabei wurden 10-20 µg Plasmid-DNA in 500 µl 250 mM $CaCl_2$ verdünnt und tropfenweise zu 500 µl 2x HBS (HEPES-gepufferte Salzlösung: 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na_2PO_4, 12 mM Dextrose, 50 mM Hepes, pH 7,05) gegeben und unter

Einleitung steriler Luft gründlich vermischt. Nach einer 20-30 minütigen Inkubation bei RT zur Ausbildung von Calciumphosphat-Präzipitaten mit der DNA wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben, wobei die Plasmid-DNA durch einen phagozytotischen Prozess von der Zelle aufgenommen werden konnte. Nach 4-6 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die Zugabe von frischem DMEM-Medium.

2.7.3 Transiente Transfektion primärer Hippocampus-Neurone

Die Transfektion von Hippocampus-Neuronen erfolgte am Tag 8 *in vitro*. Dabei wurden 10 µg Plasmid-DNA ad 90 µl H_2O verdünnt. Nach Zugabe von 10 µl 2,5 M $CaCl_2$ wurde anschließend tropfenweise 2x BBS (50mM BES (*N,N-bis[2-hydroxyethyl]-2-aminoethanesulsulfonic acid*), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2HPO_4, pH 6,96) in die DNA-Lösung unter Einleitung steriler Luft zugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation bei RT wurden jeweils 100 µl des Transfektionsansatzes pro Deckgläschen in einer 12 Loch-Platte (Greiner) auf die Zellen gegeben. Nach 6 h wurden die Zellen 2x mit HBSS (Gibco/Invitrogen) gewaschen und anschließend in Neurobasal-Medium (Gibco/Invitrogen) zur Expression kultiviert.

2.7.4 Zellextrakt aus kultivierten HEK293-Zellen

Zur immunologischen Detektion von Proteinen aus HEK293-Zellen wurde das Medium einer bewachsenen 10 cm Ø Gewebekulturschale abgesaugt und die Zellen in 500 µl Lämmli-Puffer aufgenommen, für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 4°C und 15800x g zentrifugiert. Zwanzig µl des Überstandes wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, die Proteine wurden getrennt und anschließend auf Nitrozellulose Membranen übertragen. Für die Co-Immunopräzipitation von Proteinen wurde anstelle des Lämmli-Puffers ein Co-IP-Puffer zur Lyse der Zellen verwendet (RIPA: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1% [v/v] Nonidet P 40, 0,5% [w/v] Na-Desoxycholat, 0,1% [w/v] SDS, 5 mM EDTA, Proteaseinhibitor (Roche); Bindungspuffer: 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% TritonX-100, 0,5% Nonidet P-40, Proteaseinhibitor (Roche)). Nach Zentrifugation wurde der Überstand zur Co-Immunopräzipitation eingesetzt.

2.7.5 Immuncytochemie von transient transfizierten HEK293-Zellen

Zellen wurden am Tag vor der Transfektion auf mit 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin und 12,5 µg/ml Laminin beschichtete Deckgläschen in 3 cm Ø Gewebekulturschalen mit einer Zellzahl von 1,5x 10^5 umgesetzt.

Vierundzwanzig h nach der Transfektion wurde das Medium mit dem gleichen Volumen 4 %iger Paraformaldehydlösung in PBS versetzt und für 10 min bei RT inkubiert.

Danach wurde die Lösung abgenommen und durch 4%ige Paraformaldehydlösung für 15 min ersetzt. Die fixierten Zellen wurden zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung der Zellmembran mit 0,3% TritonX-100 in PBS für 5 min bei RT inkubiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurden die Zellen für 1 h bei RT in Blockierlösung (10% [v/v] NGS, 0,3% [w/v] BSA, 0,05% [v/v] TritonX-100 in PBS) inkubiert. Daran schloss sich eine Inkubation der Primärantiköper verdünnt in Blockierlösung ü.N. bei 4°C an. Nach 3-maligem Waschen mit PBS für 5 min wurde für 2 h der Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal für 5 min mit PBS gewaschen und nach 10-minütiger Inkubation mit Dapilösung (1:10000 in PBS) in *FluoroGuard* (BioRad) eingebettet. Die Auswertung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) sowie der Software Openlab 4.0 oder einem *Laser Scanning* Mikroskop.

2.7.6 Kultivierung und Transfektion von HEK293-Zellen für Calcium-*Imaging*-Versuche mittels FLIPR

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte in für die FLIPR Apparatur (Molecular Devices) vorgesehene mit Poly-D-Lysin beschichtete 96-Loch-Multititerplatten (schwarz mit transparentem Boden, Greiner) bei 37°C und 5% CO_2 in DMEM mit 10% FCS. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 70% wurden die Zellen mit der für die FLIPR-Experimente gewählten Plasmid-DNA mit Hilfe von Lipofectamin2000 (Invitrogen) transfiziert. Hierzu wurden pro Loch 0,4 µg Plasmid-DNA und 0,6 µl Lipofectamin2000 mit jeweils 25 µl DMEM vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Zur Ausbildung des DNA-Lipid-Komplexes wurde das Lipofectamin2000-DMEM-Gemisch zu dem DNA-DMEM-Gemisch zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde vorsichtig auf die zuvor mit frischem DMEM versetzten Zellen getropft. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 h bei 37°C und 5% CO_2 wurde der Transfektions-Ansatz auf den Zellen durch DMEM, GLUTAMAX (low Glucose) mit 10% dialysiertem FCS ersetzt.

2.7.7 Calcium-*Imaging* im heterogen Expressionssystem mittels FLIPR

Die Liganden vermittelte Aktivierung von Rezeptoren im heterologen Expressionsystem wurde über die Freisetzung intrazellulären Calciums indirekt durch den calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM detektiert, wobei mit Hilfe des FLIPR (*Fluoromatric Imaging Plate Reader*) der Firma Molecular Devices Veränderungen der Calciumkonzentration fluorometrisch verfolgt werden konnten.

Dreißig Stunden nach Transfektion der Zellen wurde das Medium durch 50 µl frisch angesetztes serumfreies DMEM, GLUTAMAX mit 1% [v/v] Probenicid (Sigma) und 0,1%

[v/v] Fluo-4-AM (Molecular Probes) pro Loch ersetzt. Die Zellen wurden für eine weitere Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert, um das Fluo-4-AM intrazellulär anzureichern. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffes wurden die Zellen dreimal 30 min mit einem frisch angesetzten Waschpuffer (130 mM NaCl, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 5 mM D-Glucose) in einem Plattenwaschgerät (Denley) gewaschen, wobei nach dem letzten Waschschritt 100 µl der Waschlösung in jedem Loch übrig blieben. Direkt nach dem letzten Waschschritt 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/ sec, 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/ sec, 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 ATP (Ligand 2) in einer Endkonzentration von 1 µM appliziert. Die Veränderung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels wurde mit Hilfe des FLIPR verfolgt und anschließend über das Software Programm *FLIPR Control* (Molecular Devices) und *Sigma Plot* ausgewertet.

2.8 Arbeiten mit Hefen

2.8.1 Transformation von Hefezellen

Zur Herstellung kompetenter Hefezellen wurden 30 ml Vollmedium (YPD broth, BIO 101) mit 1 - 3 Hefekolonien inokuliert und für 16 - 20 h bei 30°C bei 250 rpm geschüttelt bis eine OD_{600} von ≥ 1,5 erreicht war. Die Hefesuspension wurde auf OD_{600} = 0,15 verdünnt und für weitere 2 - 3 h bei 30°C bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei OD_{600} = 0,4 - 0,6 unter Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 2000x g bei RT wurden die Hefezellen in H_2O resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Das Pellet mit den Hefezellen wurde in 3 ml TE-LiAc-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat) resuspendiert, kurz zentrifugiert und nochmals in 1,5 ml TE-LiAc-Lösung aufgenommen.

Für den Transformationsansatz wurden 10 µl denaturierte Heringssperm-DNA (*herring testis carrier DNA*, Clontech), für die Co-Transformation zweier Plamide jeweils 750 ng

Plasmid-DNA , 100 µl kompetente Hefezellen und 600 µl PEG/LiAc-Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 7,0, 1 mM EDTA, 100 mM Lithiumacetat, 40% Polyethylenglycol 3350) vermischt und für 30 min schüttelnd bei 100 rpm und 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl DMSO erfolgte ein 15-minütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Hefezellen wurden kurz sedimentiert, in 1 ml Hefe-Vollmedium resuspendiert und für 45 min bei 30°C geschüttelt. Die Hefekultur wurde kurz zentrifugiert und das Pellet in 500 µl H_2O resuspendiert und auf entsprechende Agarplatten (SELECT AGAR, Invitrogen Life Technologies) ausplattiert, die für mehrere Tage bei 30°C inkubiert wurden.

2.8.2 β-Galactosidase-*Assay*

Der Flüssigkulturtest zur Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität beruht auf dem Umsatz des farblosen Enzymsubstrates o-Nitrophenylgalaktosid (ONPG) zu dem gelb löslichen Produkt o-Nitrophenol, das photometrisch quantifiziert werden kann. Das Ergebnis wird in β-Galaktosidase-Einheiten ausgedrückt.

Zehn ml Selektionsmedium wurden mit 2 - 3 Kolonien Hefetransformanten inokuliert und bis zum Erreichen einer $OD_{600} \geq 1$ bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Von der Hefekultur wurden zur Doppelbestimmung je zweimal 1,5 ml für 3 min bei 16 000x g sedimentiert, das Pellet in 1 ml Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$, pH 7,0) gewaschen und anschließend in 200 µl Z-Puffer resuspendiert, wobei davon 100 µl zur Bestimmung der OD_{600} mit 1 ml H_2O verdünnt wurden. Aus den restlichen 100 µl der Hefesuspension wurde durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen ein Extrakt hergestellt. Durch Zugabe von 860 µl frisch angesetzter ONPG-Substratlösung (0,27% [v/v] β-Mercaptoethanol, 3 mM ONPG (Sigma) in Z-Puffer, pH 7,0) wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 h je nach Farbentwicklung, wurde mit 400 µl 1 M Na_2CO_3-Lösung die Reaktion gestoppt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 16 000x g wurde bei 420 nm die Photoabsorption des Überstandes bestimmt, wobei ein parallel durchgeführter Ansatz, der anstelle der 100 µl Hefesuspension lediglich 100 µl Z-Puffer enthielt, als Nullkontrolle diente. Die Enzymaktivität in β-Galaktosidase-Einheiten wurde über folgende Formel berechnet:

$1000 \times OD_{420} / (t \times V \times OD_{600})$; t= Reaktionszeit [min], V= Kulturvolumen [ml]

3. Ergebnisse

Die Untersuchungen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen innerhalb der T1R-Familie bestehen aus zwei Schwerpunkten. Der unter 3.1 beschriebene Abschnitt behandelt die Identifizierung eines neuen G-Protein-gekoppelten Rezeptors, rTRX, und dessen Einordnung in die Geschmacksrezeptorfamilie T1R. Der Abschnitt 3.2 beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Interaktion von rT1R2 und rCIB sowie deren Rolle innerhalb dieser Familie.

3.1 Identifizierung und Charakterisierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors aus der circumvallaten Papille der Ratte

Hinsichtlich des Expressionsmusters der Rezeptoren der T1R-Familie im Geschmacksgewebe von Ratte und Maus ist ein weiterer Rezeptor denkbar, der einen funktionellen Rezeptor als Heterodimer mit dem rT1R3 ausbildet (Nelson, G. *et al.*, 2001). Mit Hilfe des Programmes *BLAST Search*[1] wurde nach cDNA-Sequenzen gesucht, die Ähnlichkeiten zu dem Geschmacksrezeptor T1R2 aus der Ratte aufweisen. Dabei wurde neben den bisher bekannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) aus der T1R-Familie, dem Calcium *Sensing*-Rezeptor (CaSR) sowie dem vomeronasalen Rezeptor V2R2 eine weitere Sequenz eines bisher unbekannten GPCR aufgeführt. Durch weitere Datenbankanalysen auf dem EBI *Genome Server* (ensemble.org) des humanen Genomprojektes konnte die gesamte Sequenz identifiziert werden. Die anschließende Klonierung des humanen Rezeptors erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hartwig Schmale. Der Rezeptor wurde in Anlehnung an seine Identifizierung als TRX bezeichnet, wobei TR für *taste receptor* und X für die bisher nicht mögliche Einordnung in eine Geschmacksrezeptorfamilie steht.

3.1.1 Klonierungsstrategie

Die Amplifizierung des orthologen Rezeptors aus der Ratte erfolgte durch PCR. Zu Beginn der Klonierungsarbeiten waren lediglich Teilsequenzen des rTRX über die Datenbank des EBI *Trace Servers* (http://trace.ensembl.org/) aus dem Rattengenom bekannt. Durch die degenerierten Oligonukleotide mTRX1 und mTRX2, die aus konservierten Bereichen des humanen und murinen TRX abgeleitet wurden und weder

[1] *BLAST Search*: auf Server des *National Center for Biotechnology Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

im CaSR noch in T1R1, -2 und -3 vorhanden sind, konnte ein 800 bp großes Fragment aus dem Sequenzbereich nt 472 - 1280 aus cDNA amplifiziert werden, die ihren Ursprung in circumvallaten Papillen (CV) adulter Ratten hat. Im Laufe der Arbeit wurde von dem EBI *Trace Server* Sequenzen des TRX veröffentlicht, die die Exone 1-5 umfassten. Dies ermöglichte die Amplifizierung des am 5'-Ende beginnenden Teilfragmentes von nt 1 - 1260 aus der Ratten CV cDNA mit den genspezifischen Oligonukleotiden rTRX3 und rTRX2. Zur Identifizierung des 3'-Endes einschließlich der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) wurde eine *RACE* (*rapid amplification of cDNA ends*)-Reaktion durchgeführt, wobei das *SMART™ RACE cDNA Amplification Kit* (Clontech) eingesetzt wurde, aus dem die im Folgenden beschriebenen Oligonukleotide *Oligo-dT-Primer,* UPM und NUP stammen.

Die Erststrangsynthese erfolgte aus Gesamt-RNA enzymatisch präparierter circumvallater Papillen der Ratte mit einem *Oligo-dT-Primer*, dem am 5'-Ende 25 nt spezifisch hinzugefügt sind. Die Amplifikation des 3'-Endes erfolgte mit dem genspezifischen Oligonukleotid rTRX5 und dem UPM (*universal primer mix*). Der UPM ist ein Gemisch aus zwei Oligonukleotiden, wobei einer mit den 25 nt des O*ligo-dT-Primers* hybridisiert. Die PCR führte zu einem Gemisch aus cDNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen. Die Fragmentgrößen lagen zwischen 2000-3000 bp. Die Amplifikation einer definierten Bande bei 3000 bp wurde durch eine *Nested PCR* erreicht. Dabei wurde das genspezifische Oligonukleotid rTRX1 und das Oligonukleotid NUP (*nested universal primer*) zur PCR eingesetzt, die jeweils stromabwärts der Oligonukleotide rTRX5 und UPM hybridisieren. Als Matrize diente das primäre PCR-Produkt in einer 1:100 Verdünnung.

Die gesamte amplifizierte Sequenz von rTRX umfasst 3036 Nukleotide, wobei 249 Nukleotide zur 3'-untranslatierten Region gehören. Eine schematische Darstellung der PCR-Reaktionen, die zur Amplifizierung der rTRX-Sequenz durchgeführt wurden, ist in der Abbildung 5 dargestellt.

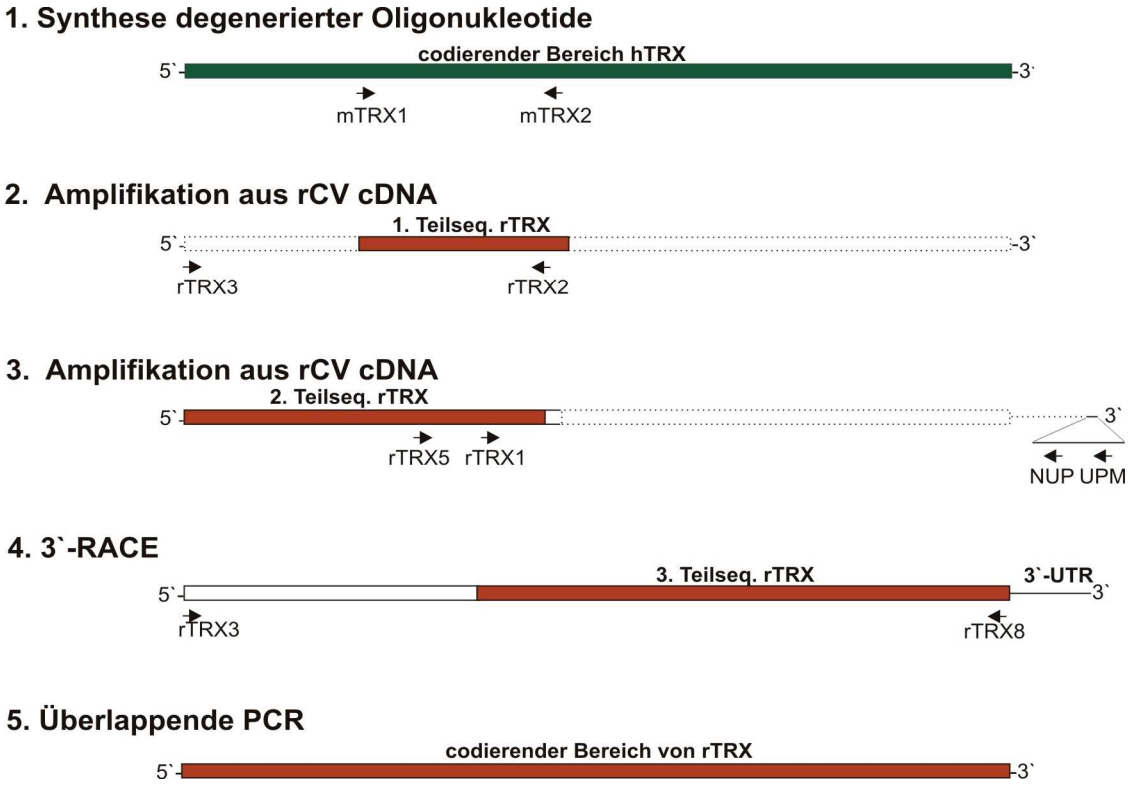


Abb. 5: Schematische Darstellung der PCR-Reaktionen zur Amplifikation von rTRX
Dargestellt sind die eingesetzten Oligonukleotide zur Amplifikation des rTRX aus cDNA, die aus mRNA isolierter circumvallater Papillen der Ratte hergestellt wurde: die degenerierten mTRX1 und mTRX2, die sequenzspezifischen rTRX2, rTRX3, rTRX5, rTRX6 und rTRX8 sowie die speziellen *RACE*-Oligonukleotide UPM und NUP. Farbige Boxen stellen codierende Bereiche dar (grün: TRX aus Mensch, rot: TRX aus Ratte). Gestrichelte Linien und Boxen stellen fehlende Sequenzbereiche dar. Die in dem angegebenen Schritt nicht amplifizierten Sequenzen sind durch farblose Boxen dargestellt. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

3.1.2 Sequenzanalyse von rTRX

Die cDNA sowie die Aminosäuresequenz von rTRX sind in Abbildung 6 dargestellt. Die codierende Sequenz des TRX aus der Ratte ist zu 78% identisch mit der humanen sowie zu 93% mit der Sequenz des TRX aus der Maus.

TRX hat eine 592 Aminosäuren umfassende extrazelluläre N-terminale Domäne, eine sieben Transmembranregion einschließlich der drei extrazellulären und der drei intrazellulären Loops und eine intrazelluläre 88 Aminosäuren umfassende C-terminale Domäne. TRX kann innerhalb der Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ebenso wie die T1R-Familienmitglieder der Subfamilie C zugeordnet werden. Datenbankanalysen[2] sagen für TRX ein Signalpeptid bestehend aus den ersten 20 Aminosäuren, einige Phosphorylierungsstellen für die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin sowie Konsensussequenzen für N-Glycosylierungen an Asparagin-Resten voraus. Am extremen C-Terminus verfügt rTRX über eine Konsensussequenz S/T-X-

[2] Datenbankanalyse: genutzt wurden die Datenbanken auf dem ExPASy Molecular Biology Server (http://us.expasy.org/)

Φ-COOH, die eine Bindung zu PDZ-Domänen vermittelt (Kornau, H.-C. *et al.*, 1995). Dabei steht S/T wahlweise für ein Serin oder Threonin, X für eine beliebige und Φ für eine hydrophobe Aminosäure, die in dem Fall des rTRX ein Isoleucin ist.
Das Polyadenylierungssignal etwa 20 nt vor dem Poly-A-Schwanz weist auf die vollständige 3'-UTR hin.

```
ATGGCCCTATCATTTGTATTTATTACTTGCTTCATGATTCTTCTTGATACCTCCCAGTCT   60
 M  A  L  S  F  V  F  I  T  C  F  M  I  L  L  D  T  S  Q  S    20
TGTCATACCCCAGATGACTTCGTGGCTATCACTTCTCCCGGACATATCATGATTGGTGGT  120
 C  H  T  P  D  D  F  V  A  I  T  S  P  G  H  I  M  I  G  G    40
TTGTTTGCCATTCACGAAAAAATGTTGTCCTCAGATGACCATCCCAGGCAACCACAAATC  180
 L  F  A  I  H  E  K  M  L  S  S  D  D  H  P  R  Q  P  Q  I    60
CAGAAGTGTGTTGGTTTTGAAATATCAGTGTTTCTTCAAACTCTGGCTATGATACACAGC  240
 Q  K  C  V  G  F  E  I  S  V  F  L  Q  T  L  A  M  I  H  S    80
ATTGAGATGATCAATAACTCAAGCCTGTTGTCCGGAGTTAAGCTGGGGTATGAAATCTAT  300
 I  E  M  I  N  N  S  S  L  L  S  G  V  K  L  G  Y  E  I  Y   100
GACACTTGTACTGAAGTCACAGCGGCAATGGCTGCCACCCTGAGGTTCCTCTCTAAATTC  360
 D  T  C  T  E  V  T  A  A  M  A  A  T  L  R  F  L  S  K  F   120
AACTGCTCTAGAGAAACCGTGATCTTTCAATGTGACTATTCCAGCTACGTGCCAAGGGTC  420
 N  C  S  R  E  T  V  I  F  Q  C  D  Y  S  S  Y  V  P  R  V   140
AAGGCCATCATAGGTGCTGGCTACTCTGAAATATCCATGGCGGTCTCGAGGATGCTGAAT  480
 K  A  I  I  G  A  G  Y  S  E  I  S  M  A  V  S  R  M  L  N   160
TTACAGCTCATGCCACAGGTGAGTTATGAATCCACTGCAGAAATCCTGAGTGACAAAATC  540
 L  Q  L  M  P  Q  V  S  Y  E  S  T  A  E  I  L  S  D  K  I   180
CGCTTTCCTTCGTTTTTACGAACCGTGCCCAGTGACTTCTACCAAACTAAAGCAATGGCC  600
 R  F  P  S  F  L  R  T  V  P  S  D  F  Y  Q  T  K  A  M  A   200
CACCTGATCCGACAATCCGGATGGAACTGGGTTGGTGCCATAACAACCGACGATGATTAT  660
 H  L  I  R  Q  S  G  W  N  W  V  G  A  I  T  T  D  D  D  Y   220
GGAAGACTAGCGCTCAACACATTTGCAATCCAGGCTGCTGAAAACAATGTGTGCATCGCC  720
 G  R  L  A  L  N  T  F  A  I  Q  A  A  E  N  N  V  C  I  A   240
TTCAAAGAGGTTCTGCCAGCCTTCCTCTCAGATAATACCATTGAAGTGAGAATCAACCAG  780
 F  K  E  V  L  P  A  F  L  S  D  N  T  I  E  V  R  I  N  Q   260
ACTCTGGAGAAAATCATTGCCGAAGCCCAGGTCAATGTCATCGTGGTGTTTCTTAGAAAA  840
 T  L  E  K  I  I  A  E  A  Q  V  N  V  I  V  V  F  L  R  K   280
TTCCACGTCTTCAATCTCTTCAACAAAGCCATCGAGAGGAAAATAAGTAAGATCTGGATT  900
 F  H  V  F  N  L  F  N  K  A  I  E  R  K  I  S  K  I  W  I   300
GCTAGTGATAACTGGTCAACTGCTGCCAAGATTATCACCATTCCCAATGTTAAGAAGCTT  960
 A  S  D  N  W  S  T  A  A  K  I  I  T  I  P  N  V  K  K  L   320
GGCAAAGTAGTGGGCTTTACTTTTAGGAGAGGAAATATGTCTTCTTTCCATTCTTTTCTT 1020
 G  K  V  V  G  F  T  F  R  R  G  N  M  S  S  F  H  S  F  L   340
CAAACTCTGCATATGTACCCCAGTGACAATAACAAACCCCTACATGAGTTTGCCATGCTT 1080
 Q  T  L  H  M  Y  P  S  D  N  N  K  P  L  H  E  F  A  M  L   360
TTTTCTGCCTGTAAACACATCAAAGATGGTGATTTGAGCCAATGCATTTCCAACTATTCT 1140
 F  S  A  C  K  H  I  K  D  G  D  L  S  Q  C  I  S  N  Y  S   380
CAGGCAACTTGGACCTATGACACTACCAAGACCATTGAGACCCATTTATTCAAGAGAAAT 1200
 Q  A  T  W  T  Y  D  T  T  K  T  I  E  T  H  L  F  K  R  N   400
GACTTCCTTTGGCATTATACTGAGCCAGGACTCATTCACAGCATTCAGCTTGCTGTGCTT 1260
 D  F  L  W  H  Y  T  E  P  G  L  I  H  S  I  Q  L  A  V  L   420
GCCTTGGGCCATGCCATCCGGGATCTGTGCCAAGATCGAGACTGCCAGAAACCCAACGCC 1320
 A  L  G  H  A  I  R  D  L  C  Q  D  R  D  C  Q  K  P  N  A   440
TTTCAGCCATGGGAGCTACTTGCGGTGCTGAAAAACGTGACATTCACTGACGGAAAAAAC 1380
 F  Q  P  W  E  L  L  A  V  L  K  N  V  T  F  T  D  G  K  N   460
TCATTTCATTTTGATGCCCATGGGGATTTAAATACTGGTTACGAGGTGGTGCTCTGGAAA 1440
 S  F  H  F  D  A  H  G  D  L  N  T  G  Y  E  V  V  L  W  K   480
GAGACTAACGGCCTCATGACTGTCACGAAGATGGCAGAATATGACCTGCAGCATGACGTC 1500
 E  T  N  G  L  M  T  V  T  K  M  A  E  Y  D  L  Q  H  D  V   500
TTCATCACCACAAACCAAGAAACAAAGCATGAATTCAGGAAACTTAAGCAAATTCTATCT 1560
 F  I  T  T  N  Q  E  T  K  H  E  F  R  K  L  K  Q  I  L  S   520
AAATGCTCCAAAGAATGCATTCCTGGTCAAATGAAGAAAGCCACAGGAAGCCAACACAGC 1620
 K  C  S  K  E  C  I  P  G  Q  M  K  K  A  T  G  S  Q  H  S   540
```

extrazellulärer N-Terminus

```
TGTTGCTATGAATGTGTGAACTGCCCAGAAAACCACTACAGTAATGAGACAGACATGGAT 1680
 C  C  Y  E  C  V  N  C  P  E  N  H  Y  S  N  E  T  D  M  D   560
CACTGCCTCGTATGCAACAACGAAACCCACTGGGCCCCAGTAAGGAGCACGATGTGCTTC 1740
 H  C  L  V  C  N  N  E  T  H  W  A  P  V  R  S  T  M  C  F   580
GAGAAGGAAGTGGAGTATCTTGACTGGGATGACTCCTTGGCTCTCCTCCTCATTGCCCTC 1800
 E  K  E  V  E  Y  L  D  W  D  D  S  L  A  L  L  L  I  A  L   600
TCCCTACTTGGAATTGCCTTTGTTCTGGCCGTTGGCATAATATTTACAAGAAACCTGAAG 1860
 S  L  L  G  I  A  F  V  L  A  V  G  I  I  F  T  R  N  L  K   620
ACACCTGTGGTGAAATCATCTGGGGGATTAGTGGTCTGTTACGTGATGCTCGCCTGCCAT 1920
 T  P  V  V  K  S  S  G  G  L  V  V  C  Y  V  M  L  A  C  H   640
GCCCTCAACTTTGCCAGCACAGGCTTTTTTATTGGAGAACCACAGGACTTCACGTGCAAG 1980
 A  L  N  F  A  S  T  G  F  F  I  G  E  P  Q  D  F  T  C  K   660
ACCAGGCAGACCCTGTTTGGCGTGAGCTTTACTCTGTGTGTCTCCTGTATTTTGACGAAG 2040
 T  R  Q  T  L  F  G  V  S  F  T  L  C  V  S  C  I  L  T  K   680
TCCCTGAAAATTTTGCTAGCCTTCAGCTTCGACCCCACGCTGAAGACATTCCTGAAGTGT 2100
 S  L  K  I  L  L  A  F  S  F  D  P  T  L  K  T  F  L  K  C   700
CTCTATAGGCCAGTCCCCATTGTCCTTACCTGCACCGGCATTCAAGTGGTCATTTGCACG 2160
 L  Y  R  P  V  P  I  V  L  T  C  T  G  I  Q  V  V  I  C  T   720
CTTTGGCTGGTCCTGGCAGCACCTACTGTGGAAGAGAACACCTCCTTGCCTAGAGTCATT 2220
 L  W  L  V  L  A  A  P  T  V  E  E  N  T  S  L  P  R  V  I   740
ATCCTAGAATGTGAGGAGGGATCTGCACTGGCGTTTGGCACCATGCTGGGCTACATTGCA 2280
 I  L  E  C  E  E  G  S  A  L  A  F  G  T  M  L  G  Y  I  A   760
GTTCTGGCCTTCATTTGTTTTGTATTTGCATTCAAGGGGAGGAAGCTTCCTGAGAATTAC 2340
 V  L  A  F  I  C  F  V  F  A  F  K  G  R  K  L  P  E  N  Y   780
AACGAAGCTAAGTTCCTGACCTTTGGGATGCTGATTTACTTCATAGCTTGGATCACATTC 2400
 N  E  A  K  F  L  T  F  G  M  L  I  Y  F  I  A  W  I  T  F   800
ATCCCAGTCTATGCTACCACTTTCGGCAAGTATTTGCCCGCTGTGGAGATCATAGTCATT 2460
 I  P  V  Y  A  T  T  F  G  K  Y  L  P  A  V  E  I  I  V  I   820
CTGATATCCAACTATGGTATCCTCTGCTGTACATTCTTCCCCAAGTGCTACATTATTCTT 2520
 L  I  S  N  Y  G  I  L  C  C  T  F  F  P  K  C  Y  I  I  L   840
TGCAAGCAAAAGACTAACACTAAGTCAGTCTTCCTCCAGATGGTTTACAATTACTCTGCT 2580
 C  K  Q  K  T  N  T  K  S  V  F  L  Q  M  V  Y  N  Y  S  A   860
CACAGCGTGGACAGCCTTGCCTTGAGTCACGTATCCCTGGACTCCGCCAGCCACAGTACT 2640
 H  S  V  D  S  L  A  L  S  H  V  S  L  D  S  A  S  H  S  T   880
GCAACAACCAACCCGAGGCCTGGTAACAAGACTGCAGCCTGTCAGAATTACAAACATCTT 2700
 A  T  T  N  P  R  P  G  N  K  T  A  A  C  Q  N  Y  K  H  L   900
CCTGTACAAGTGCTTGCTCACACAGGCATGGAAAAGACTATGCACGCGTCTAAAACTTTG 2760
 P  V  Q  V  L  A  H  T  G  M  E  K  T  M  H  A  S  K  T  L   920
CATCAGAAAAGAAGTTCAAGTATATGACTGAGTTCTCAGGAGAGGCTATGATTCCCCAAT 2820
 H  Q  K  R  S  S  S  I  *                                    929
AAGATGTTTCTGGTGATGGCTGCAAATTGTGTATTTATTTTTCTTAGCAAATACATCTTG 2880
GGTTTTTGTTGTTTGTTTGGTTTCTGTTTTTCTTCTTTGCTTTTTGGGGTTCTTCTTTCT 2940
ACCACTTTCTTGAACACTCTGTTCAACTTCATTCTGTTTAACAATCTGCTAATAAAAAAT 3020
AGTTTCCATAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAA                         3056
```

7TMR

C-Terminus

3`-UTR

Abb. 6: rTRX-cDNA und Aminosäuresequenz
Durchnummerierte Nukleotidsequenz einschließlich der 3´-untranslatierten Region und der Aminosäuresequenz von rTRX. Start- und Stopcodon fett gedruckt. Die sieben Transmembranregionen (7TMR) sind grün unterlegt. Die extrazellulären Schleifen innerhalb der TMR sind unterstrichen. Vorhergesagtes Signalpeptid ist blau unterlegt. Mögliche Glycosylierungen der AS Asparagin sind mit rotem Kasten umrandet, Phosphorylierungsstellen der AS Serin (S), Threonin (T) und Tyrosin (Y) sind mit blauem Kreis umrandet. PDZ-Domänen-bindende Sequenz am extremen C-Terminus ist rot gekennzeichnet. Das Polyadenylierungssignal innerhalb der 3'-UTR ist unterstrichen.

Durch eine Datenbanksuche mit Hilfe des Programmes *BLAST search* wurden die Rezeptoren gesucht, die die höchsten Identitäten zu rTRX auf Proteinebene aufweisen. Dabei wurden Teilsequenzen des Geruchs-Rezeptors aus dem Goldfisch (*Carassius auratus*, ca) mit den höchsten Identitäten sowie Sequenzbereiche des Calcium *Sensing* Rezeptors, des T1R3, des T1R2, des T1R1 und des V2R2 aufgeführt. Die Tabelle 7 zeigt die Identitäten des rTRX zu diesen Rezeptoren in ihrer gesamten Länge ausgewertet über das Software-Programm DNAstar. Die Identität von rTRX zu caOR5.24 liegt bei 48%, zu dem rCaSR bei 37%, zu den Rezeptoren der T1R-Familie rT1R1 bei 31%, rT1R2 bei 29% und rT1R3 ebenfalls bei 29%. Eine geringere Identität weist der rV2R2 mit 13% zu dem rTRX auf.

Rezeptor und Datenbank-Zugriffsnummer	**Identitäten zu rTRX**
caOR5.24 (AAD46570)	48%
rCaSR (AAO59490)	37%
rV2R2 (XP_227211)	13%
rT1R1 (AAD18069)	31%
rT1R2 (AAD18070)	29%
rT1R3 (AF456324)	29%

Tab. 7: Identitäten zu rTRX auf Proteinebene
Aufgeführt sind die Rezeptoren, die die höchsten Identitäten zu rTRX aufweisen, caOR5.24, rCaSR, rV2R2, rT1R1, -2 und -3 sowie deren Zugriffsnummer zur Datenbank.

Die über die Datenbanksuche aufgeführten Rezeptoren werden ebenfalls wie der TRX der Subfamilie C zugeordnet. In Abbildung 7 ist jeweils mindestens ein Mitglied einer der Subfamilie C zugehörigen Rezeptorfamilie in einem phylogenetischen Stammbaum mit dem TRX aus der Ratte dargestellt. Dabei zeigen sich zwei evolutionär früh geteilte Hauptzweige auf. Auf dem einen befinden sich die metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGluR6 und mGluR7, der vomeronasale Rezeptor V2R2 und die $GABA_B$-Rezeptoren R1 und R2. Der rTRX, der caOR5.24, der Calcium *Sensing*-Rezeptor sowie die Rezeptoren der T1R-Familie bilden den zweiten Hauptzweig, wobei rTRX den höchsten Verwandtschaftsgrad zu dem Geruchs-Rezeptor aus dem Goldfisch OR5.24 und dem CaSR aufweist.

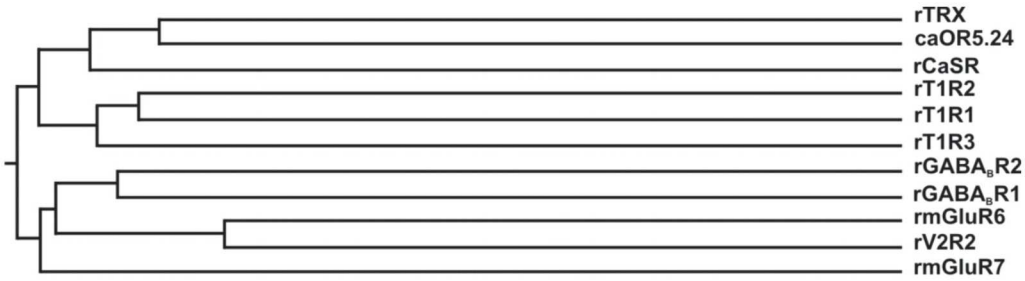


Abb. 7: Phylogenetischer Verwandtschaftsgrad von TRX zu Mitgliedern der Subfamilie C der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
Dargestellt ist der phylogenetische Verwandschaftsgrad von rTRX zu den Rezeptoren caOR5.24, rCaSR, rT1R1, -2 u. -3, rGABA$_B$R1 und -R2, rmGluR6 und -R7 sowie rV2R2 in einem Dendrogramm.

3.1.3 Expressionsmuster von rTRX in Geweben der Ratte

Die Mitglieder der T1R-Familie werden spezifisch in Geschmacksgewebe exprimiert. Ob dies ebenfalls für den rTRX zutrifft, wurde mittels RT-PCR-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen untersucht. Dabei galt, neben dem Geschmacksgewebe, besonderes Interesse dem olfaktorischen Epithel aufgrund des nahen Verwandtschaftsgrades zu dem Geruchs-Rezeptor caOR5.24 aus dem Goldfisch.

3.1.3.1 RT-PCR-Analyse

Für die RT-PCR-Untersuchungen wurde mRNA aus sensorischem Gewebe wie der enzymatisch präparierten fungiformen, foliaten und circumvallaten Geschmackspapillen aus Rattenzungen, des am Gaumen befindlichen Geschmacksstreifens, des olfaktorischen Epithels sowie weiterer nicht sensorischer Gewebe wie Zungenepithel, Skelettmuskel, Gehirn, Herz und Niere eingesetzt. Zum Nachweis des rTRX wurden zunächst die sequenzspezifischen Oligonukleotide rTRX9 und rTRX10 eingesetzt, die ein 691 bp langes Teilfragment (nt 1740 - 2431) der cDNA des rTRX umfassen. Als Kontrolle wurden die sequenzspezifischen Oligonukleotide rhHGPRTf und rhHGPRT2r zur Amplifizierung eines 525 bp großen Teilfragmentes (nt 20 - 545) der cDNA der konstitutiv exprimierten Hypoxanthin-Guanin-Phospho-Ribosyltransferase (HGPRT) eingesetzt.
Wie in der Abbildung 8 (A) zu sehen ist, konnte die mRNA des rTRX in Geschmacksstreifen, der circumvallaten Papille und der foliaten Papille der Ratte nachgewiesen werden. Aus der RNA des Zungenepithels, des olfaktorischen Epithels, der fungiformen Papillen sowie aus der RNA der nicht sensorischen Gewebe wie

Skelettmuskel, Gehirn, Herz und Niere konnte die cDNA von rTRX nicht reproduzierbar detektiert werden.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei diesen Amplifikaten um genomische DNA handelt, wurden zusätzlich die Oligonukleotide rTRX4 und mTRX2 eingesetzt. Da rTRX4 an eine Sequenz innerhalb des Exons 2 und mTRX2 innerhalb des Exons 3 hybridisiert, wird von diesen Oligonukleotiden ein 834 bp großes Fragment der rTRX-cDNA (nt 486 - 1302) amplifiziert, das über eine Exon-Intron Grenze geht. Dabei zeigte sich wiederum das stärkste Signal im Geschmacksstreifen und ebenfalls Amplifikate aus der cDNA der circumvallaten sowie foliaten Papillen. Zudem erscheinen aber auch schwache Banden in Zungenepithel, olfaktorischem Epithel und in der Niere (B).Die cDNA der rHGPRT konnte aus allen präparierten Geweben in äqivalenten Mengen amplifiziert werden (C). rTRX scheint somit nur sehr schwach im Zungenepithel, olfaktorischem Epithel und in der Niere vorzukommen, was auch durch eine nicht reproduzierbare Amplifikation aus diesen cDNAs deutlich wird. Die präferentielle Expression des rTRX liegt im Geschmacksstreifen von Ratten vor.

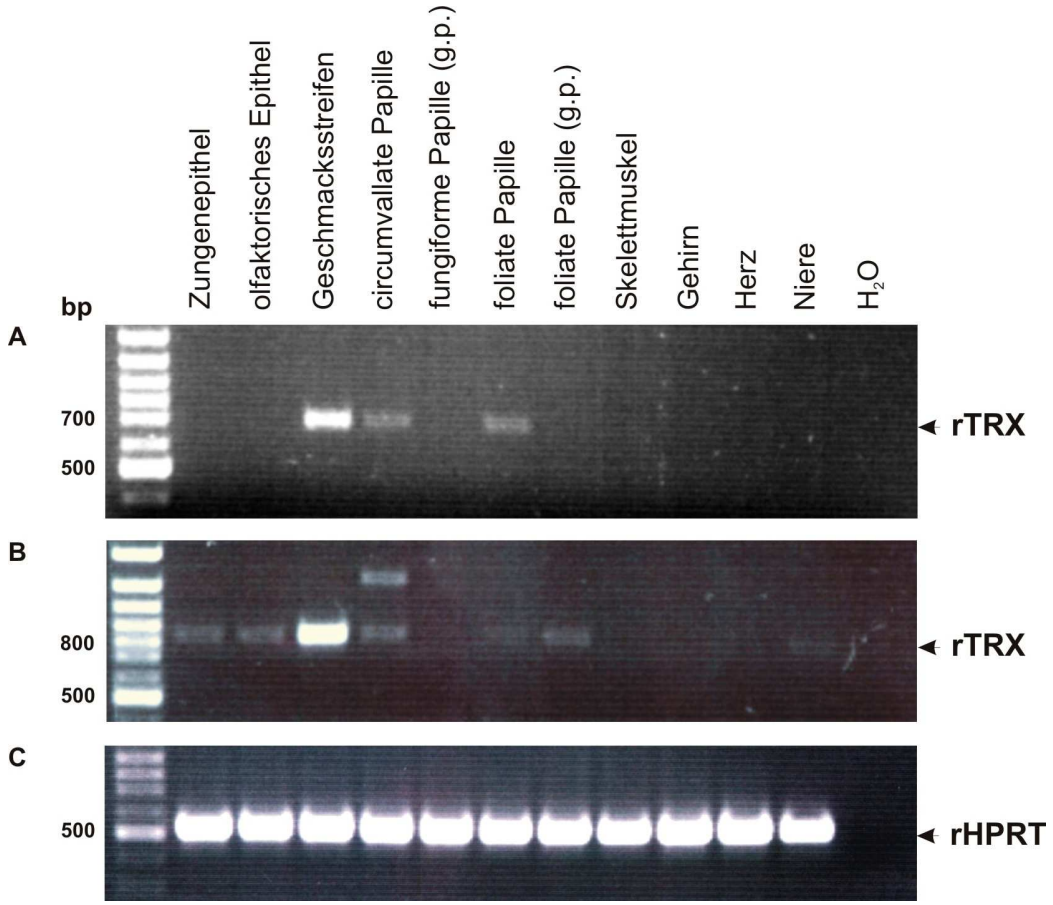


Abb. 8: Expression von rTRX in sensorischem und nicht sensorischem Gewebe
A: Amplifizierung der rTRX-cDNA (nt 1740 - 2431) mit rTRX9 und rTRX10.
B: Amplifizierung der rTRX-cDNA (nt 486 - 1302) mit rTRX4 und mTRX2.
C: Amplifizierung der HGPRT-cDNA (nt 20 - 545) mit rhHGPRTf und rhHGPRT2r
g.p.: grob präpariert

3.1.3.2 *In situ* Hybridisierung

Da die RT-PCR-Untersuchungen das intensivste Signal für rTRX, neben dem in den circumvallaten Papillen und den foliaten Papillen, in dem Geschmacksstreifen (GS) aufzeigt, wurden zur Detektion der rTRX-mRNA im Geschmacksstreifen und zudem in circumvallaten Papillen *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Hierfür wurden Gefrierschnitte eines quer geschnittenen GSs sowie einer circumvallaten (CV) Papille aus einer adulten Ratte zur Hybridisierung mit einem Teilfragment der rTRX-mRNA (nt 1 - 960) hergestellt. Als Kontrollansätze wurden auf Gefrierschnitten die RNA-Sonden des rT1R3 (nt 1 - 840) und des Gustducins (nt 1 - 590) zu deren Nachweis eingesetzt. Zur Herstellung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurden PCR-Produkte der jeweiligen Sequenzen verwendet, die durch die Klonierung in den Vektor pBlueskript flankierend die Promotorsequenzen des T7- und T3-Promotors enthalten. Damit konnte von dem PCR-Produkt je nach Wahl der T7- oder T3-RNA-Polymerase der *sense*- sowie der *antisense*-Strang synthetisiert werden. Nach Hybridisierung der Digoxigenin-markierten RNA-Sonden erfolgte die Detektion über einen Alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten anti-Digoxigenin-Antikörper, wobei die AP das Substrat BCIP/NBT zu einem blauen unlöslichen Farbstoff umsetzt.

Die Abbildung 9 zeigt die Hybridisierung mit jeweils *sense* und *antisense* RNA-Sonde von rTRX, rT1R3 und rGustducin. Sowohl für rT1R3 als auch für Gustducin konnte die mRNA in den Papillen des GSs und der CV Papille nachgewiesen werden. Die Hybridisierung mit den jeweiligen *sense*-Sonden zeigen dabei keine signifikanten Hintergrundfärbungen. Für die mRNA von rTRX konnte, im Vergleich zu dem Gewebeschnitt, der für die Hybridisierung mit der sense-Sonde eingesetzt wurde, kein eindeutiges Signal sowohl in den Papillen des GSs als auch in denen der CV detektiert werden. In dem angrenzenden Epithel innerhalb des GSs ist ebenfalls für die mRNA von rTRX keine überzeugende Färbung zu sehen. Andere Sequenzbereiche zur Herstellung einer weiteren rTRX-Sonde führten ebenfalls nicht zu einer Detektion der rTRX-mRNA in den Papillen. Möglicherweise wird dieser Rezeptor nur schwach im Geschmacksstreifen exprimiert, so dass rTRX zwar durch die sensitive RT-PCR nachgewiesen werden kann, die Menge an rTRX-mRNA aber nicht zum Nachweis durch *in situ* Hybridisierung ausreicht.

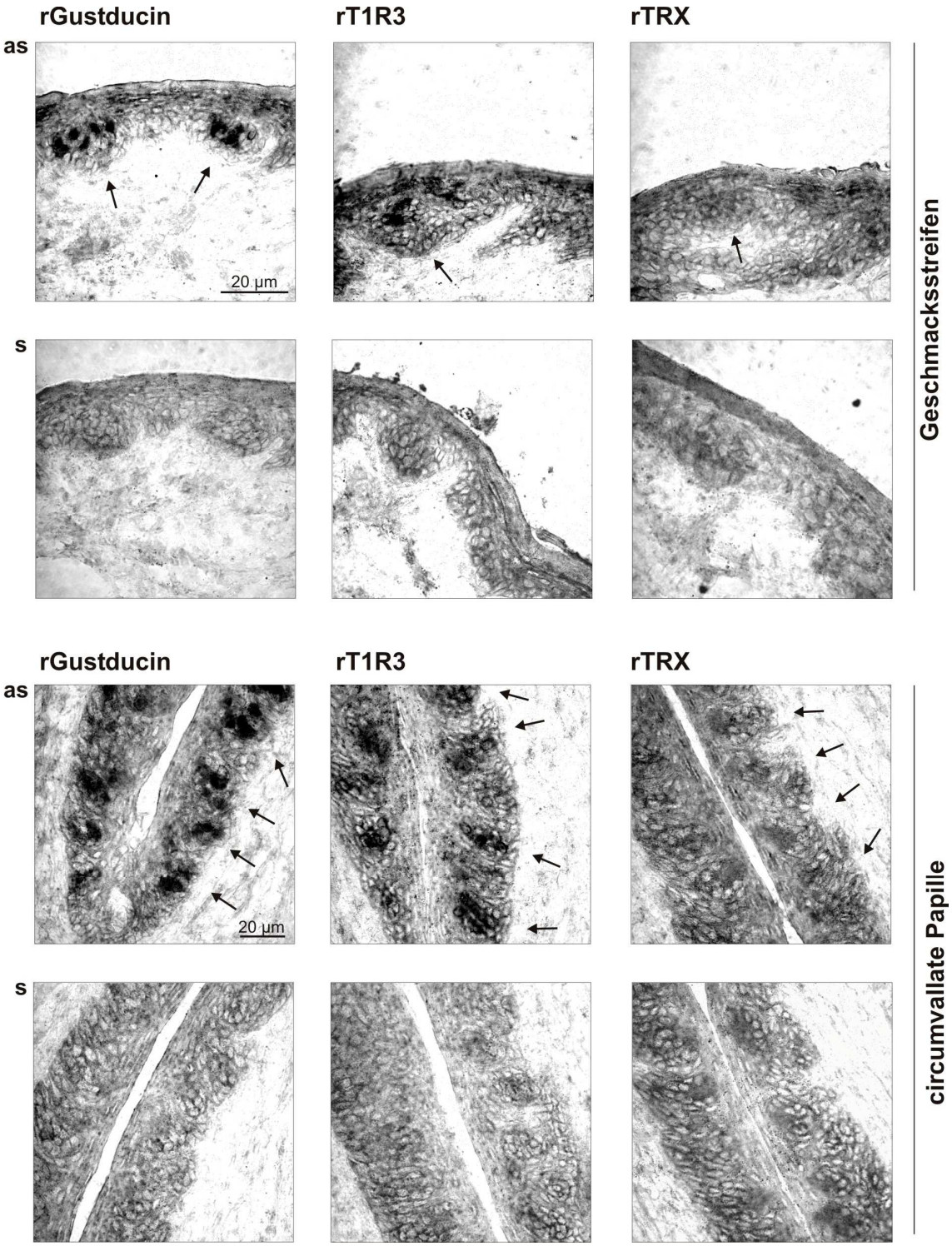


Abb. 9: *In situ* Hybridisierung an Gewebschnitten des Geschmackssteifens und der circumvallaten Papille
Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt eines quer geschnittenen GS sowie einer CV Papille. Die Gewebeschnitte zur Detektion der mRNA von rGustducin, rT1R3 und rTRX wurden jeweils mit einer antisense (as) Sonde hybridisiert. Zur Kontrolle wurden Schnitte mit den jeweiligen sense (s) Sonden behandelt. Die Pfeile zeigen auf die Geschmacksknospen innerhalb des GS und der CV Papille.

3.1.4 Untersuchungen zur Heterodimerisierung des rTRX mit dem rT1R3 aus der T1R-Familie

Die RT-PCR-Analysen zeigen eine spezifische Expression des rTRX im Geschmacksgewebe (vgl. 3.1.3.1). Allerdings konnte eine direkte Lokalisation der rTRX-mRNA in Geschmackspapillen nicht nachgewiesen werden, was ein direkter Hinweis für rTRX als Geschmacksrezeptor gewesen wäre. Da rTRX nicht, wie aufgrund der hohen Identitäten zu dem Geruchs-Rezeptor OR5.24 aus dem Goldfisch vermutet, vorwiegend in Geruchsepithel exprimiert wird, ist die Zugehörigkeit des rTRX in die Geschmacksrezeptorfamilie T1R dennoch denkbar. Die Rezeptoren T1R1 und T1R2 bilden jeweils mit dem T1R3 einen heterodimeren Umami- bzw. Süß-Rezeptor aus. Inwieweit rTRX ebenfalls mit dem T1R3 dimerisiert, wurde durch Interaktionsversuche und Lokalisationsstudien im heterologen Zellsystem untersucht, um so durch einen weiteren Ansatz den Nachweis einer Zugehörigkeit des rTRX als Geschmacksrezeptor zu erbringen.

3.1.4.1 Lokalisationsexperimente im heterologen Expressionssystem

Um die Lokalisation des Rezeptors rTRX im heterologen Zellsystem zu untersuchen, wurden HEK293-Zellen und primäre Hippocampus-Neurone (Tag 8, *in vitro*) mit dem Expressionsvektor rTRX-HSV-pcDNA3 transfiziert. Dadurch wird rTRX in voller Länge als Fusionsprotein mit einem C-terminalen HSV-Peptid exprimiert. Neben den Expressionsanalysen in HEK293-Zellen sollte durch die Wahl der Hippocampus-Neurone der neuronale Charakter von Geschmackssinneszellen mit berücksichtigt werden, da diese Zellen möglicherweise Chaperone exprimieren, die zur Membranlokalisierung der Rezeptoren essentiell sein könnten. Zum Vergleich wurden die Rezeptoren rT1R2, fusioniert mit einem C-terminalem HSV-Peptid, und rT1R3, fusioniert mit einem C-terminalem FLAG-Peptid, ebenfalls in HEK293-Zellen sowie den Neuronen exprimiert. Für den rTRX und den rT1R2 erfolgte deren Detektion immuncytochemisch über das HSV-Epitop mit einem primären anti-HSV-Antikörper und einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper. rT1R3 wurde über das FLAG-Epitop mit einem primären anti-FLAG-Antikörper und in HEK293-Zellen mit einem sekundären Alexa^{488}-konjugierten - und in den Neuronen ebenfalls mit dem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper detektiert. Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, zeigen alle drei Rezeptoren weder in HEK293-Zellen noch in den Neuronen eine eindeutige Lokalisation an der Plasmamembran. Während die Rezeptoren rT1R2 und rTRX in HEK293-Zellen, neben einer überwiegend cytoplasmatischen Verteilung, eine partielle Lokalisation an der Plasmamembran vorweisen, können sie in den Neuronen

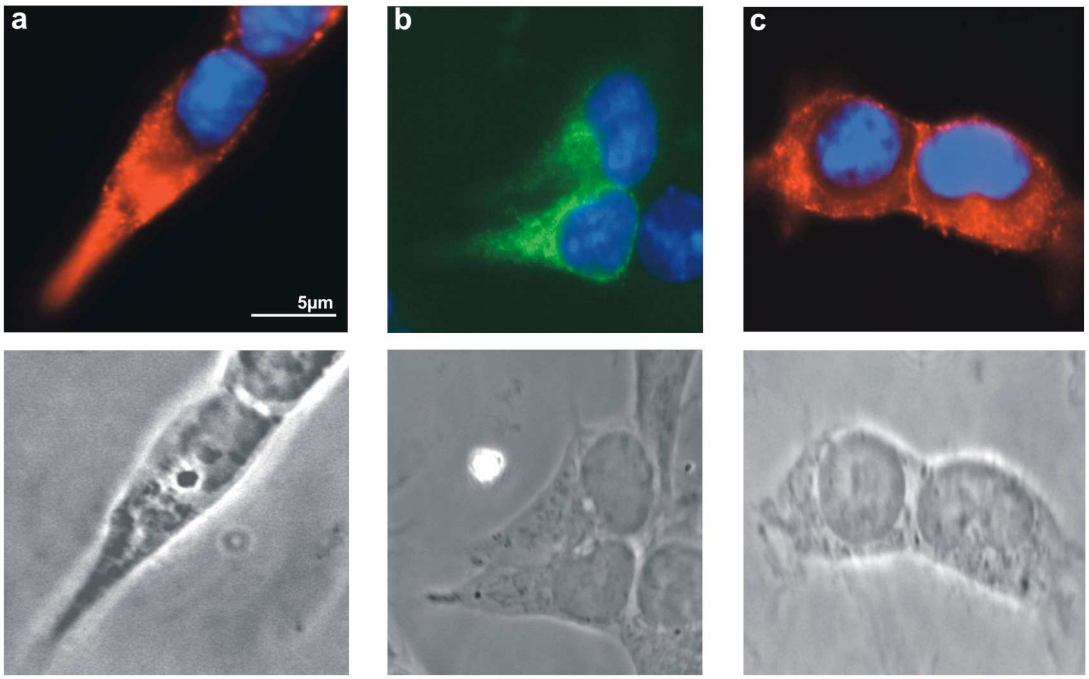
nur im Cytoplasma und in den proximalen Bereichen der Dendriten detektiert werden. Der rT1R3 befindet sich in HEK293-Zellen im Cytplasma und angereichert um den Zellkern, was auch in Neuronen beobachtet werden kann.

Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass rTRX, rT1R2 und rT1R3 weder in HEK293-Zellen noch in Hippocampus-Neuronen zur Zelloberflächenexpression in der Lage sind, wenn sie jeweils unabhängig voneinander exprimiert werden.

Eine transiente Co-Expression des rT1R2 bzw rTRX mit rT1R3 führte ebenfalls zu keiner Lokalisation der Rezeptoren an der Plasmamembran in HEK293-Zellen und in den Neuronen (Daten nicht gezeigt).

Auch für eine von Marcel Winnig (DifE, Potsdam) erhaltene stabile Zelllinie, die die Rezeptoren rT1R2 und rT1R3 stabil exprimiert und die in FLIPR-Experimenten zur Untersuchung der Liganden-vermittelten Rezeptoraktivierung messbare Signale für die Liganden des rT1R2+3 zeigt, kann für die Rezeptoren immuncytochemisch ebenfalls nur eine überwiegend cytoplasmatische Lokalisation festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

A HEK293-Zellen:



B HC-Neurone:

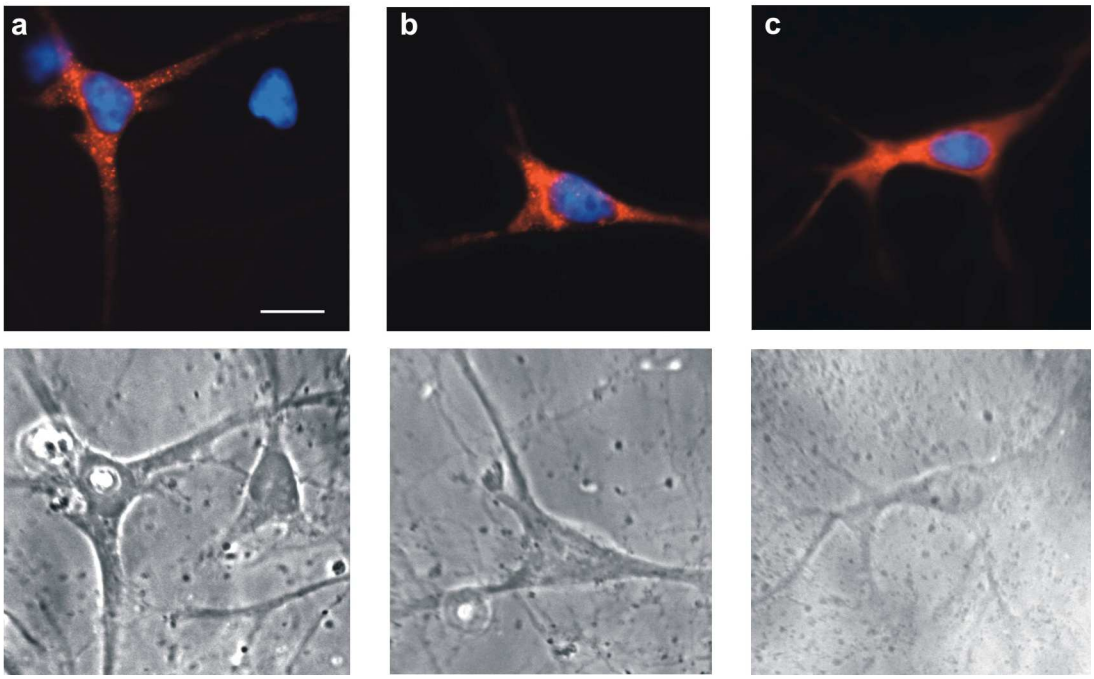


Abb. 10: Verteilung von rekombinant exprimiertem rT1R2-HSV, rT1R3-FLAG und rTRX-HSV in HEK293-Zellen und Hippocampus-Neuronen (HC-Neurone)
A: transient transfizierte HEK293-Zellen, B: transient transfizierte Hippocampus-Neurone.
a: rT1R2-HSV, b: rT1R3-FLAG und c: rTRX-HSV. Dargestellt sind jeweils Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahme; Kernfärbung erfolgte mit dem Farbstoff DAPI. Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

3.1.4.2 Co-Immunopräzipitation aus stabil transfizierten HEK293-Zellen

Die separat in HEK293-Zellen sowie in Neuronen exprimierten Rezeptoren zeigen keine Membranlokalisation. Dabei zeigt der rT1R3 eine auffällige Anreicherung in der Nähe des Zellkerns, wobei es sich vermutlich um ER oder den Golgi-Apparat handelt. Eine ähnliche Lokalisation ist für den metabotropen GABA-Rezeptor $GABA_BR1$ beschrieben. Dieser enthält ein ER-Retentionssignal am C-Terminus, das durch die Interaktion mit dem C-Terminus des $GABA_BR2$ maskiert wird, und somit der Transport zur Plasmamembran erfolgen kann (White, J.H. *et al.*, 1998).

Obwohl bei einer Co-Expression keine Lokalisation an der Plasmamembran beobachtet werden konnte, ist auch hier eine Interaktion der C-terminalen Domänen des rT1R1 bzw. rT1R2 mit rT1R3, über die die Heterodimerisierungen der funktionellen Aminosäure- bzw. Süß-Rezeptoren vermittelt werden, denkbar. Inwieweit dies für die Rezeptoren rT1R1, rT1R2 sowie für den rTRX jeweils mit dem rT1R3 zutreffen könnte, wurde zunächst durch Interaktions-Experimente mit Hilfe des Hefe Zwei-Hybrid-Systems analysiert. Dabei zeigte sich keine Interaktion zwischen den C-terminalen Domänen des rT1R1, -2 sowie rTRX mit der des rT1R3 (Daten nicht gezeigt).

Da die zur funktionellen Expression nötige Dimerisierung nicht über den C-Terminus vermittelt wird, sollte eine mögliche Dimerisierung durch Expression in HEK293-Zellen mit anschließender Co-Immunopräzipitation des gesamten Rezeptors gezeigt werden.

Hierbei wurde eine von Marcel Winnig (DifE, Potsdam) zur Verfügung gestellte Flp-In-293-Zelllinie verwendet, die den rT1R3, der am C-Terminus mit einem HSV-Epitop markiert ist, stabil exprimiert. Zur Co-Expression von C-terminal FLAG-markierten rT1R2 und rTRX mit jeweils rT1R3 wurden die Plasmide rT1R2-FLAG-pcDNA5FRT und rTRX-FLAG-pcDNA5FRT in die stabile Zelllinie transient transfiziert. Nach einer Inkubation von 36 h wurden die Zellen in RIPA-Puffer lysiert und die Lysate für die Co-Immunopräzipitation (Co-IP) eingesetzt. Dabei wurde zuerst das Zelllysat mit Protein-A-Agarose vorinkubiert, um zu kontrollieren, ob die Proteine nicht schon unspezifisch an die Agarose binden. Nach dieser Präinkubation wurde das Zelllysat in äquivalente Volumina aufgeteilt, um es zum einen mit einem anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gekoppelt ist, und zum anderen als Kontrolle mit unspezifischen IgGs gebunden an Protein-A-Agarose für 12 h inkubiert. Nach mehrmaligem anschließenden Waschen mit RIPA-Puffer wurde der Proteinkomplex über den an Agarose gebundenen Antikörper präzipitiert. Die Analyse der Co-IP erfolgte nach PAGE durch Western Blot. Dabei wurden jeweils gleiche Mengen des Zelllysates (Inputs, I), des Präzipitates der Präinkubation (PI), des Überstandes (Proteingemisch, das nicht über die an Agarose gebundenen Antikörper präzipitiert wurde, Ü) und des Präzipitates der Co-IP-Ansätze (P) auf zwei Gele aufgetragen. Ein anschließender Blot wurde zur

Detektion der präzipitierten Proteine rT1R2-FLAG und rTRX-FLAG mit einem anti-FLAG-Antikörper inkubiert. Der zweite Blot wurde für den Nachweis des co-präzipitierten rT1R3-HSV mit einem anti-HSV-Antikörper inkubiert.

Wie in Abbildung 11 (A) zu sehen ist, konnte rT1R3-HSV über rT1R2-FLAG co-präzipitiert (P) werden. In der Kontrolle sind beide Rezeptoren nicht nachweisbar, da weder rT1R2-FLAG noch rT1R3-HSV über die unspezifischen IgGs präzipitiert wurden. Die detektierten Proteine zeigen ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa. Das erwartete Molekulargewicht liegt bei ca. 90 kDa für rT1R3 und für rT1R2. Die Rezeptoren könnten hier als Dimere vorliegen, die durch das DTT im Probenpuffer nicht zerstört werden, wie dies auch für andere oligomerisierte GPCRs beobachtet werden kann.

Aus dem Zelllysat mit rTRX-FLAG und rT1R3-HSV konnte ebenfalls rTRX-FLAG durch die anti-FLAG-Antikörper gekoppelte Agarose präzipitiert werden (B). Da rTRX rekombinant nur sehr schwach exprimiert wird, wurde für diesen Co-IP-Ansatz eine größere Menge an Zellextrakt eingesetzt. Somit ist TRX-FLAG zwar nicht im Input (I) und Überstand (Ü) nachweisbar, aber durch die Anreicherung um den Faktor 100 im Präzipitat der mit Anti-FLAG-Antikörper gekoppelten Agarose detektierbar. Zudem kann T1R3-HSV im Präzipitat detektiert werden. Da dieser in der Kontrolle ebenfalls wie rTRX-FLAG nicht präzipitiert wird, kann man davon ausgehen, dass auch rT1R3-HSV über rTRX-FLAG co-präzipitiert werden kann und somit rTRX ebenfalls wie rT1R2 mit rT1R3 dimerisiert.

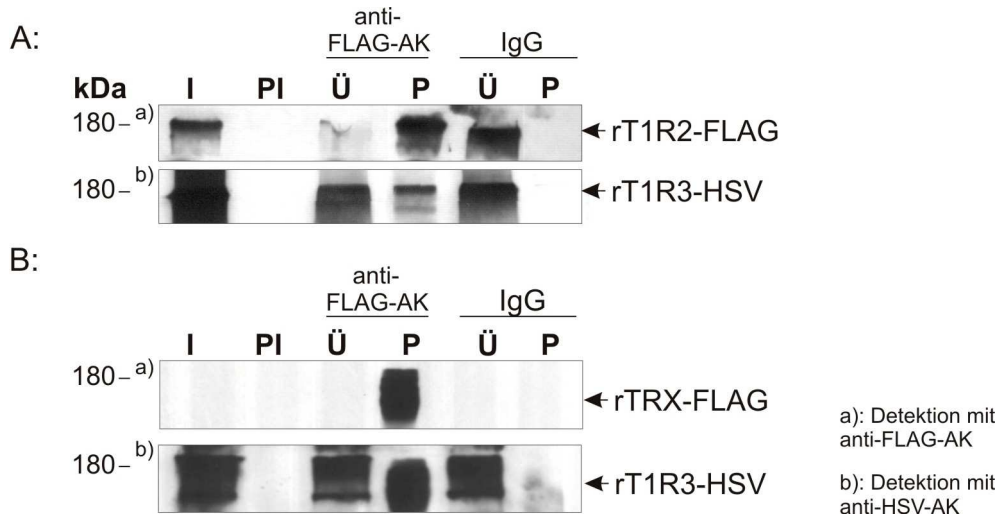


Abb. 11: Co-Immunopräzipitation von rT1R2-FLAG bzw. rTRX-FLAG mit rT1R3-HSV
Präzipitiert wurde mit einem anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Agarose gekoppelt war. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit unspezifischen IgGs gebunden an Protein-A-Agarose durchgeführt. Die rekombinant exprimierten Rezeptoren wurden über die Epitop-Markierung detektiert: rT1R2-FLAG und rTRX-FLAG mit einem anti-FLAG-Antikörper (a), rT1R3 mit einem anti-HSV-Antikörper (b). A: Co-IP aus Zellextrakt mit den rekombinant exprimierten Rezeptoren rT1R2-FLAG und rT1R3-HSV. B: Co-IP aus Zellextrakt mit den rekombinant exprimierten Rezeptoren rTRX-FLAG und rT1R3-HSV.
I: Input, PI: Präinkubation, Ü: Überstand, P:Präzipitat

3.2 Charakterisierung der Interaktion des rCIB-Proteins mit der C-terminalen Domäne des rT1R2 aus der Ratte

3.2.1 Hefe Zwei-Hybrid-*Screen*

Zur Identifizierung von Proteinen, die spezifisch mit der intrazellulären C-terminalen Domäne des Ratten-T1R2 interagieren, wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Gabriel Frank (in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Schmale) ein Hefe Zwei-Hybrid-*Screen* mit einer humanen Keratinocyten-cDNA-Bibliothek (in dem pACT-2-Vektor) durchgeführt. Da eine für das Hefesystem geeignete cDNA-Bibliothek aus Geschmacksgewebe zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand, wurde eine käufliche humane Keratinocyten-cDNA-Bibliothek gewählt. Eine ähnliche Proteinzusammensetzung wie in Keratinocyten ist im Geschmacksgewebe zu erwarten, da Geschmackssinneszellen sich aus Epithelzellen unter dem Einfluss unbekannter Faktoren, zu denen die Induktion durch Nervenfasern gehören kann, differenzieren.

Nach mehreren Selektionsverfahren handelte es sich bei den 24 positiv verbliebenen Klonen 14 mal um das humane Calcium- und Integrin-bindende Protein (hCIB), wobei diese Klone sich in dem Vorhandensein bzw. in der Länge der 5'-untranslatierten Region unterschieden.

Für weiterführende Untersuchungen zur Interaktion mit dem T1R2 aus der Ratte wurde ebenfalls für CIB die cDNA-Sequenz aus der Ratte eingesetzt, die über die Datenbank des *NCBI*-Servers veröffentlicht war. Die Klonierung der rCIB-Sequenz erfolgte mit genspezifischen Oligonukleotiden aus einer circumvallaten Papillen-cDNA adulter Ratten.

3.2.2 Sequenzanalyse von rCIB

Die cDNA- sowie die Aminosäuresequenz von rCIB sind in der Abbildung 12 dargestellt. rCIB weist eine Identität von 94% zu dem humanen CIB sowie 96% zu dem in der Maus vorkommenden Ortholog auf. Für CIB werden auch die synonymen Bezeichnungen *Calmyrin, DNA-PKcs interacting protein, Kinase interacting protein* und KIP1 verwendet. CIB hat zwei funktionelle EF-Handmotive, über die die Calcium-Bindung erfolgt (Naik, U.P. *et al.*, 1997) und gehört zur Superfamilie der Calcium-bindenden Proteine. Weiterhin verfügt CIB am N-Terminus über eine Konsensus-Sequenz zur Myristoylierung (MGXXXS), über die eine Assoziation des Proteins an Membranen erfolgen kann (O´Callaghan, D.W. *et al.*, 2002).

Um bekannte Domänen innerhalb des rCIB-Proteins zu identifizieren, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln, wurde die Proteinsequenz mit Hilfe der

Datenbank Prosite[3] analysiert. Neben den EF-Handmotiven zur Calcium-Bindung, einiger putativer Phosphorylierungsstellen für die Protein-Kinase C und Casein-Kinase II sowie der Konsensus-Sequenz zur Myristoylierung wurden von dieser Datenbank keine bekannten Domänen aufgeführt, die eine Protein-Protein-Interaktion vermitteln könnten.

```
CCACGCGTCCGGTTGGCCGAGCTGTGCGCGCACCGCGGCGATGGGAGGTTCGGGCAGTCG  60
                                         M  G  G  S  G  S  R   7
CCTGTCTAAGGAGCTGCTGGCCGAGTACCAGGACCTGACGTTCCTGACCAAGCAGGAGAT 120
 L  S  K  E  L  L  A  E  Y  Q  D  L  T  F  L  T  K  Q  E  I  27
CCTCCTTGCCCACAGACGCTTTTGCGAGTTGCTTCCCCCAGAGCATCGGACCGTGGAAGA 180
 L  L  A  H  R  R  F  C  E  L  L  P  P  E  H  R  T  V  E  E  47
GTCACTGCATACCCGAGTATCTTTTGAGCAGATCCTCAGCCTTCCAGAGCTCAAGGCCAA 240
 S  L  H  T  R  V  S  F  E  Q  I  L  S  L  P  E  L  K  A  N  67
CCCCTTCAAGGAGCGAATCTGCATGGTCTTCTCGACGTCGCCTACCAGAGACAGCCTGAG 300
 P  F  K  E  R  I  C  M  V  F  S  T  S  P  T  R  D  S  L  S  87
CTTTGAGGACTTCCTGGACCTCCTGAGTGTCTTCAGTGACACAGCAACCCCAGACATCAA 360
 F  E  D  F  L  D  L  L  S  V  F  S  D  T  A  T  P  D  I  K 107
GTCACACTATGCCTTCCGCATCTTTGACTTTGATGATGATGGAACCCTGGACAGAGAAGA 420
 S  H  Y  A  F  R  I  F  D  F  D  D  D  G  T  L  D  R  E  D 127
CCTGAGCCGGCTTGTGAACTGCCTCACGGGAGAGGGCGAGGACACTCGGCTCAGTGCTTC 480
 L  S  R  L  V  N  C  L  T  G  E  G  E  D  T  R  L  S  A  S 147
TGAGATGAAGCAGCTCATCGACAATATCCTGGAAGAGCTGGACATTGACAGGGATGGGAC 540
 E  M  K  Q  L  I  D  N  I  L  E  E  S  D  I  D  R  D  G  T 167
CATCAATCTCTCCGAGTTCCAGCACGTCATCTCTCGCTCACCAGACTTTGCCAGCTCCTT 600
 I  N  L  S  E  F  Q  H  V  I  S  R  S  P  D  F  A  S  S  F 187
TAAGATTGTCCTGTGATGGCTTTCAAGTACCAACATCCTGTCCAAGACCTTTCCACTGCT 660
 K  I  V  L  *
GAGATGTGGCCAAGGTTATGCCTGCGGTGTCAGGGCCAGAGCCGGCCCAGCCTGGAGAGG 720
GCGCTGCAGAGTCTGGCCCCCTGGCAGGGGAGGACTCTCCCCCTTGTCACTGCTGTTGCC 780
ATCACTGTTTTTACTAATTGGTAATAAAGGTTTAGAATTGTT                   840
```

Abb. 12: cDNA- und Aminosäuresequenz von rCIB
Aminosäuresequenz (fett gedruckt) und Nukleotidsequenz mit Teilsequenzen der 5'- sowie der vollständigen 3'- untranslatierten Region (UTR) von rCIB. Start- und Stopcodon: fett. Zwei EF-Handmotive (grau-grün unterlegt) liegen im C-terminalen Bereich des Proteins. Die putativen Aminosäuren, die durch Proteinkinase C phosphoryliert werden, sind orange, die durch Casein Kinase II grün umrandet. Aminosäure, an die voraussichtlich eine Myristoyl-Gruppe kovalent gekoppelt ist, ist durch eine rote Box gekennzeichnet. Die Erkennungssequenz zur Polyadenylierung (AATAAA) im Bereich der 3'-UTR ist unterstrichen.

Anhand des Verwandtschaftsgrades zu bekannten Proteinen, deren Funktionen weitestgehend bekannt sind, können mögliche Eigenschaften auf das zu untersuchende Protein abgeleitet werden. Die Proteine, die die höchsten Identitäten zu rCIB (Datenbank-Zugriffsnummer: CAF136585) auf Proteinebene aufweisen, wurden mit Hilfe der Datenbank BLAST aufgeführt. In der Tabelle 8 sind die Proteine mit den höchsten Identitäten aufgelistet. Dabei zeigt rCIB neben dem humanen und murinen Otholog die höchsten Identitäten zu den beiden Protein mit bisher unbekannter Funktion KIP2 und KIP3 mit 39 bzw. 40% sowie zu Calcineurin B mit 29%.

[3] Datenbank Prosite: EXPASY Molecular Biology Server (Internetadresse: http://us.expasy.org/)

Protein und Spezies	Datenbank-Zugriffsnummer	Identitäten zu rCIB
CIB, Maus	BAA36165	96 %
CIB (KIP1), Mensch	AAC51106	94 %
KIP3, Mensch	AB050868	40%
KIP2, Mensch	AB012955	39%
CalcineurinB, Mensch	AAB08721	29%
CalcineurinB, Ratte	BAA03422	29%

Tab. 8: Proteine mit den höchsten Identitäten zu rCIB
Aufgeführt sind der Name des Proteins, dessen Spezies, die Datenbank-Zugriffsnummer sowie dessen Identitäten zu rCIB, ermittelt über einen Sequenzvergleich mit dem Softwareprogramm DNAStar.

3.2.3 Spezifität der Bindung

Da im Hefe Zwei-Hybrid-System eine humane Keratinocyten-cDNA-Bibliothek zur Identifizierung des humanen CIB als putativer Interaktionspartner von T1R2 aus der Ratte eingesetzt wurde, musste zunächst geklärt werden, inwieweit das Ratten-Ortholog von CIB ebenfalls mit der C-terminalen Domäne des rT1R2 interagiert. Zusätzlich wurde der Frage nachgegangen, ob CIB ein genereller Interaktionspartner der T1R-Familienmitglieder einschließlich des TRX ist, oder ob die Interaktion nur spezifisch für den T1R2 ist. In Transformationsexperimenten im Hefe Zwei-Hybrid-System wurde die cDNA des Ratten-CIB in dem Plasmid pGADT7 in den Hefestamm AH109 mit den jeweiligen Sequenzen, die für die C-Termini des rT1R1, rT1R2, rT1R3 und rTRX codieren, in dem Plasmid pGBKT7 co-transformiert. Damit sind rCIB als Hybrid-Protein an die GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne und die C-Termini von T1R1, -2, 3 und TRX jeweils als Hybrid-Proteine an die GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert. Im Fall einer Wechselwirkung der variablen Proteinanteile werden DNA-Binde- und Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe gebracht und können so über den GAL4-Promoter die Transkriptionsaktivierung der Reportergene *lacZ*, *HIS3* und *ADE2* bewirken. Die Gene *LEU2* und *TRP1* liegen auf den Vektoren pGADT7 bzw. pGBKT7, so dass Hefetransformanten auf einem Selektionsmedium ohne Leucin und Tryptophan wachsen können. Im Fall einer Interaktion können die co-transformierten Hefezellen zusätzlich ohne Adenin und Histidin wachsen. Die Aktivierung der Transkription des Reportergenes *lacZ* wurde durch Messung der enzymatischen Aktivität der β-Galaktosidase überprüft.

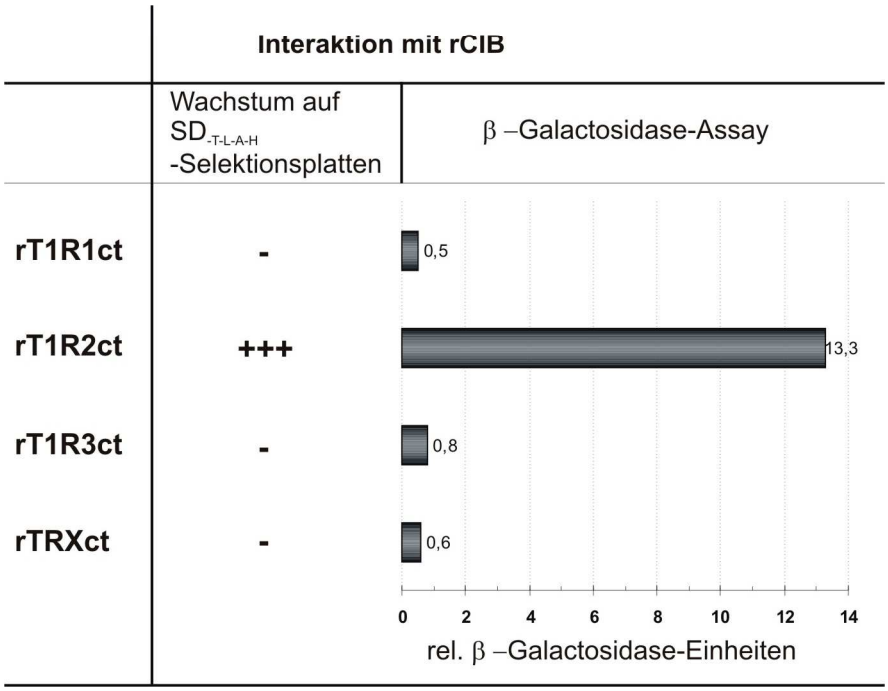


Abb. 13: Schematische Darstellung der Transformationsexperimente in der Hefe zur Untersuchung der Interaktion von rCIB mit den Mitgliedern der T1R-Familie
Eingesetzt wurde das vollständige rCIB-Protein, um auf Fähigkeit zur Interaktion mit den C-terminalen Domänen von rT1R1, -2 und -3 zu testen. – keine oder +++ starke Interaktion gibt die Fähigkeit zum Wachstum auf den Selektionsplatten wieder. Die Aktivität der β-Galaktosidase der Hefe-Transformanten ist in relativen Einheiten als Balkendiagramm dargestellt.

Die in Abbildung 13 dargestellten Transformationsexperimente zeigten, dass das Ratten-Ortholog von CIB ebenfalls mit der C-terminalen Domäne des rT1R2 interagiert. Die in relativen β-Galaktosidase-Einheiten gemessene Aktivität der Transformanten liegt bei 13,3. Die Hefe-Transformanten von rCIB mit den beiden weiteren Mitgliedern der T1R-Familie, rT1R1 und rT1R3, sowie dem rTRX zeigen weder die Fähigkeit zum Wachstum auf den Selektionsplatten, noch weisen sie eine signifikant messbare β-Galaktosidase-Aktivität auf.

3.2.4 Identifizierung einer die Interaktion mit rT1R2 vermittelnden Domäne innerhalb des rCIB-Proteins

Die Datenbank-Analyse mit der Aminosäuresequenz von rCIB führte keine bekannten Domänen auf, die eine Protein-Protein-Wechselwirkung vermitteln könnte. Um einen Bereich innerhalb des Proteins eingrenzen zu können, der für die Interaktion mit dem C-Terminus von rT1R2 verantwortlich ist, wurden Proteinfragmente von rCIB hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften im Hefesystem getestet. Zunächst wurden die cDNA-Fragmente von rCIB, die für den N-Terminus (AS 1 - 114) und den C-Terminus (AS 108 - 191) codieren, in den Hefe-Vektor pGADT7 kloniert. Die entsprechenden an

die GAL4-AD fusionierten Proteine wurden im Hefe Zwei-Hybrid-System auf die Fähigkeit zur Interaktion mit rT1R2 untersucht, wobei die Sequenz des C-Terminus von rT1R2 zur Fusionierung an die GAL4-DNA-BD in den Hefe-Vektor pGBKT7 kloniert wurde. Nachdem weder das N-terminale noch das C-terminale Fragment die Fähigkeit zur Interaktion mit rT1R2ct zeigten, wurden zusätzliche cDNA-Konstrukte hergestellt, die sich in einem weiten Bereich überlappen. Allerdings fand auch in diesem Fall mit keinem der Teilfragmente (AS 1 - 147 und AS 60 - 191) eine eindeutige Interaktion statt, wobei schwach wachsende Hefekolonien im Fall des Proteinfragmentes (AS 1 - 147) auf den Selektionsplatten zu beobachten waren. Demnach konnte kein Sequenzmotiv oder ein Bereich innerhalb des rCIB-Proteins identifiziert werden, über die eine Wechselwirkung mit rT1R2ct vermittelt wird. Für die Interaktion mit der C-terminalen Domäne des rT1R2 ist zur Ausbildung der richtigen Konformation die vollständige Sequenz des rCIB-Proteins notwendig. Abbildung 14 gibt einen Überblick über die konstruierten Fragmente des rCIB-Proteins und fasst die Ergebnisse der Interaktions-Tests zusammen.

rCIB	Interaktion mit der C-terminalen Domäne von rT1R2
$rCIB_{AS\ 1-191}$	+++
$rCIB_{AS\ 1-114}$	-
$rCIB_{AS\ 108-191}$	-
$rCIB_{AS\ 1-147}$	(+)
$rCIB_{AS\ 60-191}$	-

Abb. 14: Schematische Darstellung der Eingrenzung einer Interaktionsdomäne von rCIB mit dem Hefe Zwei-Hybrid-System
Dargestellt sind die rCIB-Teilfragmente sowie die Fähigkeit zur Interaktion mit dem C-Terminus von rT1R2 im Hefe Zwei-Hybrid-System. Die eingesetzten Bereiche des rCIB-Proteins sind durch die Aminosäuren angegeben. Rote Boxen stellen EF-Handmotive dar. Die Fähigkeit auf den $SD_{-T-L-A-H}$-Selektionsplatten zu wachsen ist durch +++: starkes Wachstum, (+): sehr schwaches Wachtum und -: kein Wachstum angegeben.

3.2.5 Expressionsmuster des rCIB in sensorischem Gewebe und anderer Organe der Ratte

Die Voraussetzung für eine Interaktion des rCIB mit rT1R2 *in vivo* ist die Expression von rCIB im Geschmacksgewebe von Ratten. Um den Nachweis der Expression von rCIB im Geschmacksgewebe zu erbringen, wurden immunhistochemische Untersuchungen an Gewebeschnitten der circumvallaten Papille der Ratte sowie Northern Blot- und RT-PCR-Untersuchungen durchgeführt.

3.2.5.1 Northern Blot

Um die Gewebeverteilung der rCIB-mRNA zu untersuchen, wurde zunächst eine Northern Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurde ein von Heidje Christiansen (IZKN, AG Schmale) hergestellter Blot verwendet, für den jeweils 18 µg Gesamt-RNA aus verschiedenen Rattengeweben, einschließlich des Zungenepithels sowie der circumvallaten Papille, verwendet wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit radioaktiv markierter rCIB-cDNA (nt 1–576). Zur Kontrolle diente eine Aktin-Sonde.

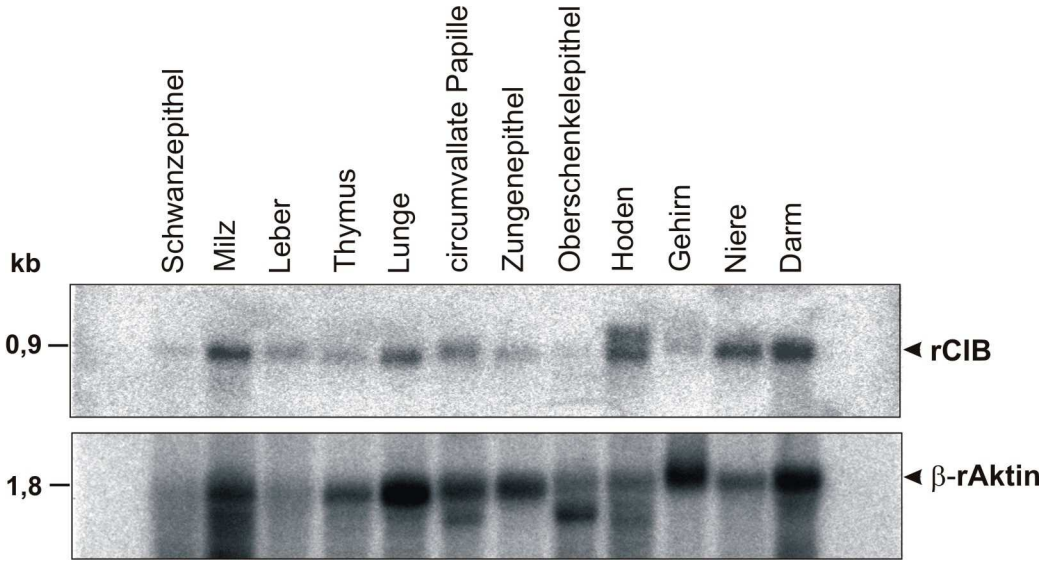


Abb. 15: Expression der CIB-mRNA in verschiedenen Rattengeweben
Das Expressionsmuster und die Größe der rCIB-mRNA wurden mittels Northern Blot analysiert. Hierzu wurde ein Blot, der Gesamt-RNA aus verschiedenen Rattengeweben, einschließlich des Zungenepithels und der circumvallaten Papille, enthielt, mit einer ^{32}P-markierten Sonde aus der Ratten CIB-cDNA (nt 1 - 576) hybridisiert. Als Kontrolle wurde der Blot mit ^{32}P-markierter Sonde spezifisch für β-Aktin hybridisiert. Die Expositionszeit auf einer für [^{32}P] sensitiven Phosphoimager-Platte betrug 3 h.

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, wurde die CIB-mRNA in allen auf dem Blot vorkommenden Geweben auf einer Höhe von 0,9 kb detektiert. Die ermittelte Größe entspricht damit der Länge der rCIB-cDNA einschließlich der untranslatierten Bereiche. Bei der im Hoden bei 1,2 kb zusätzlich erscheinenden Bande könnte es sich um eine

Variante der rCIB-mRNA mit einer längeren 5'-UTR handeln. Der Aktin-Blot zeigt, dass in einigen Geweben, wie z.B. bei circumvallaten Papillen, neben der β-Aktin-mRNA auch die α-Aktin-mRNA zu detektieren ist, was auf Präparation des darunter liegenden Muskelgewebes zurückzuführen sein könnte.
Die CIB-mRNA ist ubiqutär verteilt und kann auch in circumvallaten Papillen der Ratte nachgewiesen werden. Sie zeigt allerdings keine Spezifität für ein bestimmtes Gewebe.

3.2.5.2 Immunhistochemie

Für die Untersuchungen zur Expression des rCIB-Proteins wurden Gewebeschnitte aus der circumvallaten Papille eingesetzt, da der Rezeptor rT1R2 in den circumvallaten Papillen exprimiert wird und somit rCIB ebenfalls dort zu erwarten ist. Die immunhistochemische Detektion des rCIB-Proteins erfolgte mit einem anti-hCIB-Antikörper, der freundlicherweise von Dr. Uhlas Naik (Universität von North Carolina) zur Verfügung gestellt wurde. Als Kontrolle wurde ein anti-Gustducin-Antikörper zur Detektion von Gustducin eingesetzt. Die Paraffinschnitte der circumvallaten Papille wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Ralf Middendorf (UKE, Hamburg) vorbereitet und konnten direkt für die Immunhistochemie eingesetzt werden.
Zusätzlich zu den Gewebeschnitten zur Detektion des endogenen rGustducins und rCIB wurden äquivalent behandelte Schnitte zur Kontrolle eingesetzt. Bei diesen wurde die Inkubation mit dem Primärantikörper durch Antikörper-Verdünnungslösung ersetzt, um mögliche unspezifische Hintergrundfärbungen, verursacht durch die darauf folgenden Antikörper (siehe 2.6.9), abgleichen zu können.
Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, konnte das Protein Gustducin spezifisch in den Geschmacksknospen der cirvumvallaten Papille detektiert werden. Dabei zeigt sich sehr deutlich, dass nur einige Zellen innerhalb der Geschmacksknospen ein Signal für Gustducin aufweisen, bei denen es sich vermutlich um die Geschmackssinneszellen handelt. Der Kontroll-Gewebeschnitt ohne anti-Gustducin-Antiköper zeigt keine unspezifischen Signale. Der Gewebeschnitt zur Detektion des endogenen CIB zeigt Signale in Zellen innerhalb der Geschmacksknospen der circumvallaten Papille, die zwar schwächer aber ähnlich dem Signal von Gustducin sind. Allerdings zeigt der Kontrollschnitt ebenfalls Färbung in den Geschmacksknospen. Es kann für den Fall von CIB keine eindeutige Lokalisierung im Geschmacksgewebe festgestellt werden, da nicht zwischen einem spezifischen oder aber unspezifischen Signal unterschieden werden konnte. Möglicherweise ist der anti-CIB-Antikörper, der gegen das humane Antigen gerichtet ist, nicht ausreichend, um ein eindeutiges Signal, das sich von der unspezifischen Hintergrundfärbung abhebt, zu liefern.

Um unabhängig eines Antikörpers die Expression von rCIB im Geschmacksgewebe nachweisen zu können, wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Doch auch hier konnte, im Vergleich zu den in diesen Experimenten eingesetzten Kontrollansätzen, kein eindeutiges Signal für die mRNA von rCIB detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

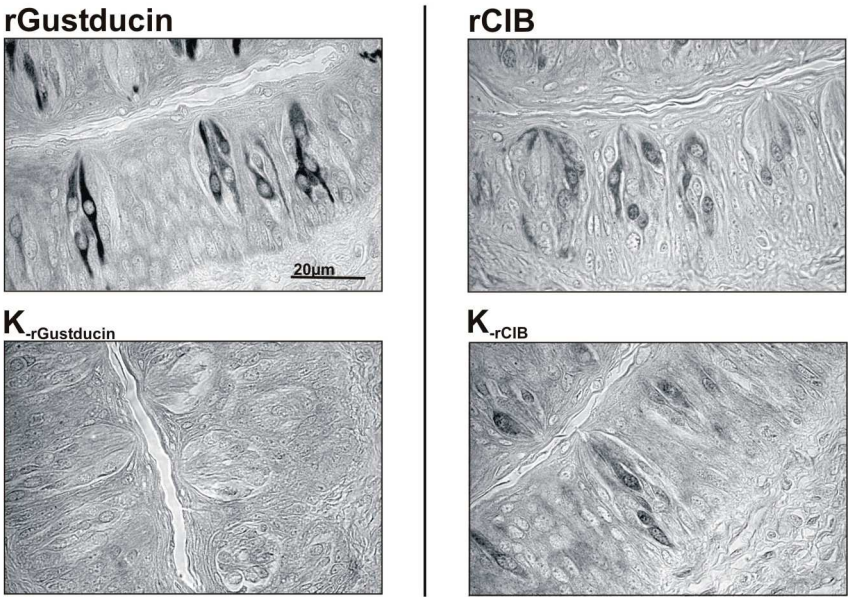


Abb. 16: Immunhistochemische Detektion von rCIB und rGustducin in der circumvallaten Papille der Ratte
Dargestellt sind jeweils Ausschnitte aus einer quer geschnittenen circumvallaten Papille, die die längs angeschnittenen Geschmacksknospen enthält. Der Gewebeschnitt zur Detektion von rGustducin wurde mit einem anti-Gustducin-Antikörper und der zur Detektion von rCIB mit einem anti-hCIB-Antikörper inkubiert. Die Kontrollschnitte $K_{-rGustducin}$ und K_{-rCIB} wurde äquivalent nur ohne jeweiligen Primärantikörper behandelt. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Mikroskopes (Leitz) im Phasenkontrast erstellt.

3.2.5.3 RT-PCR

Eine detaillierte Analyse des Expressisonsmusters von rCIB erfolgte durch RT-PCR (Abb. 17). Hierfür wurde RNA aus sensorischem Gewebe wie enzymatisch präparierte fungiformer, foliater und circumvallater Geschmackspapillen aus Rattenzungen, des am Gaumen befindlichen Geschmacksstreifens, des olfaktorischen Epithels sowie weiterer nicht sensorischer Gewebe wie Zungenepithel, Skelettmuskel, Gehirn, Herz und Niere eingesetzt. Für weitere Untersuchungen im heterologen Zellsystem mit HEK293-Zellen (vgl. 3.2.11), wurde zudem mRNA dieser Zelllinie eigesetzt, um zu untersuchen, ob CIB endogen vorhanden ist. Mit dem anti-CIB-Antikörper konnte CIB auch in HEK293-Zellen nicht immuncytochemisch detektiert werden.

Zur Amplifizierung des Teilfragmentes der CIB-cDNA-Sequenz (nt 203 - 532) wurden die sowohl zur humanen als auch Ratten-Sequenz komplementären Oligonukleotide

rhCIB C und rhCIB D eingesetzt. Zur Kontrolle der cDNA wurden die Oligonukleotide rhActI und rhActII zur Amplifizierung der Aktin-cDNA (nt 1 - 570) in der PCR verwendet.

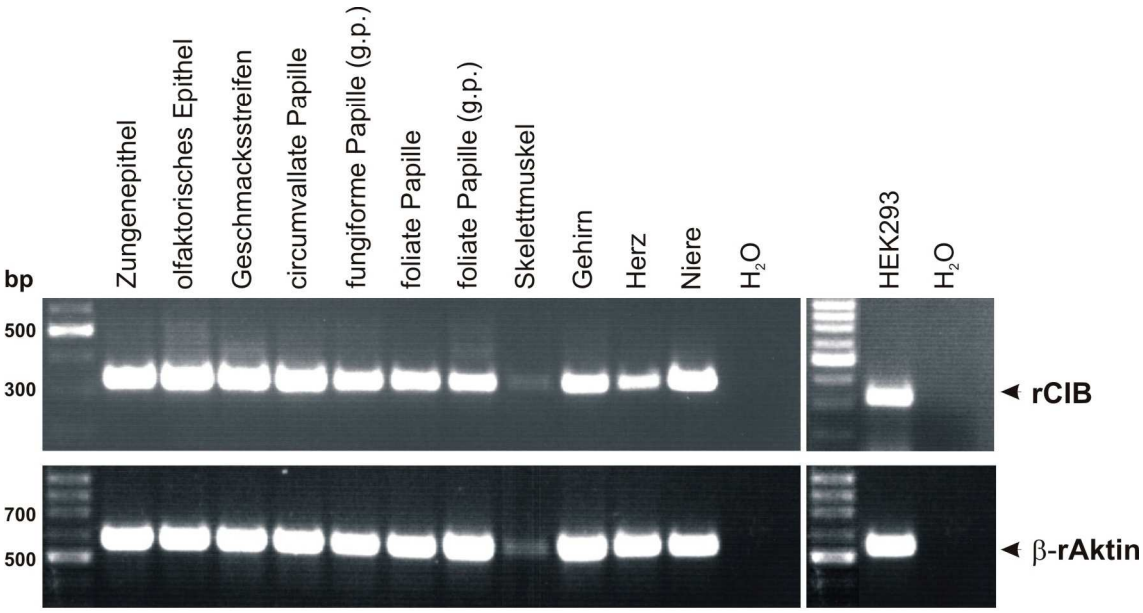


Abb. 17: Expression von rCIB in sensorischem Gewebe
Eingesetzt wurden cDNAs aus sensorischem Gewebe: Olfaktorisches Epithel, Geschmacksstreifen, circumvallate Papille, fungiforme Papille, foliate Papille und nicht sensorischem Gewebe: Zungenepithel, Skelettmuskel, Gehirn, Herz, Niere. Zur Kontrolle wurde statt cDNA H_2O eingesetzt. g.p.: grobe Präparation. DNA-Längenstandard: 100bp Marker

Das 330 bp große Fragment der rCIB-cDNA konnte von allen isolierten RNAs der unterschiedlichen sensorischen sowie nicht sensorischen Geweben amplifiziert werden. Auch in der Zelllinie HEK293 kann die mRNA von hCIB nachgewiesen werden. Die β-Aktin-cDNA wurde, abgesehen von der cDNA des Skelettmuskels, aus allen eingesetzten cDNAs in vergleichbaren Mengen amplifiziert. Wie die Northern Blot- Analysen zeigen auch die RT-PCR-Ansätze, dass die CIB-mRNA ubiqitär verbreitet ist und zudem in allen sensorischen Geweben vorkommt.

3.2.6 Verifizierung der Protein-Protein-Interaktion im *GST-Pulldown-Assay*

Unspezifische Protein-Protein-Interaktionen können in dem Hefe Zwei-Hybrid-System auf eine falsch-positive Aktivierung der Reportergene zurückzuführen sein. Um dies ausschließen zu können, ist ein Systemwechsel nach einem Hefe-*Screen* zur weiteren Charakterisierung einer Interaktion notwendig. Der *GST-Pulldown-Assay* wurde durchgeführt, um in einem zellfreien System *in vitro* den Nachweis der direkten Protein-Protein-Interaktion zu erbringen.

3.2.6.1 Expression und Aufreinigung von GST und GST-rCIB-Fusionsprotein

Die Plasmidkonstrukte pGEX-JDK und pGEX-JDK-rCIB-HA wurden zur Expression von GST-Myc und GST-rCIB-HA in *E. coli* eingesetzt. Die Fusionsproteine wurden über ihren GST-Anteil mit Glutathion-Sepharose affinitätschromatographisch aufgereinigt.

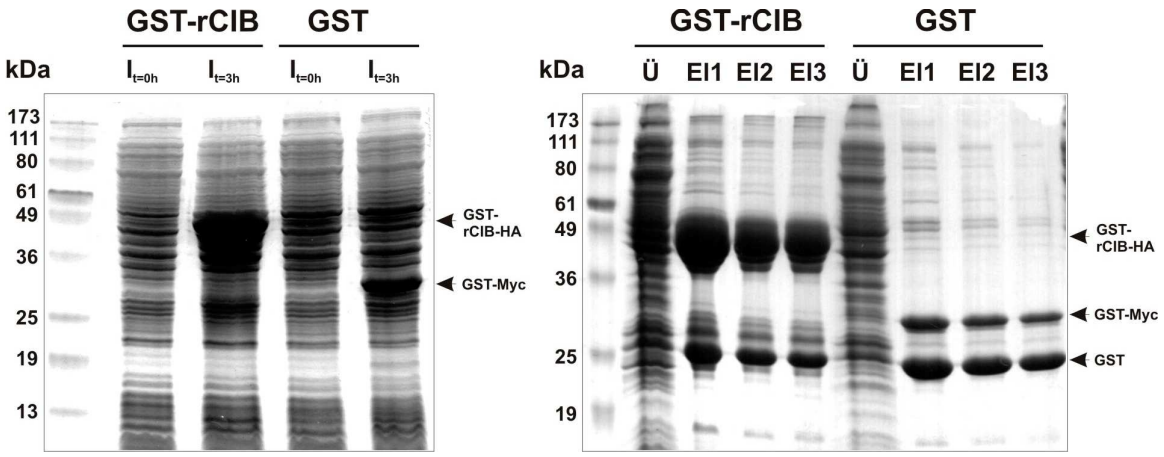


Abb. 18: Induzierte Expression und Aufreinigung von GST-Myc- und GST-rCIB-HA-Fusionsproteinen
Zur Analyse der mit Coomassie gefärbten Proteine im Acrylamidgel wurden jeweils 10 µl Probe aufgetragen.
Linkes Gel: Die Induktion der Expression von GST-rCIB-HA und GST-Myc erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG, wobei $I_{t=0h}$ Zeitpunkt der IPTG-Zugabe und $I_{t=3h}$ nach drei Stunden Proteinexpression darstellt.
Rechtes Gel: Aufreinigung der Zelllysate über Glutathion Sepharose; Ü Überstand nach Bindung des Zelllysates an Glutathion Sepharose, EI1-3 mit jeweils 30 µl 10 mM red. Glutathion eluierte Proteine

Die in Abbildung 18 dargestellten mit Coomassie gefärbten SDS-Gele dokumentieren die induzierte Proteinexpression von GST-Myc und GST-rCIB-HA und dessen affinitätschromatographische Aufreinigung. Nach Induktion der Kulturen mit IPTG erscheint GST-rCIB-HA als stark exprimierte Bande bei 49 kDa und GST-Myc bei 28 kDa. Beide Proteine werden in dem Eluat der Glutathion-Sepharose angereichert. In beiden Ansätzen erscheint nach der Elution eine zusätzlich angereicherte Proteinbande bei 25 kDa, bei der es sich um den GST-Anteil handeln könnte, der möglicherweise im Laufe der Aufreinigung proteolytisch abgespalten wurde. Das

Erscheinen dieser zusätzlichen 25 kDa Bande ist auch in anderen Arbeitsguppen am Institut bei der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen beobachtet worden. Weitere schwach erscheinende Banden sind unspezifische Proteine. Die Eluate wurden für die weitere Verwendung im GST-*pulldownAssay* zusammengeführt und, um eine erneute Bindung an die Sepharose zu ermöglichen, durch Dialyse von dem reduzierten Glutathion befreit.

3.2.6.2 *in vitro* Expression von rT1R2 im Retikulocytenlysat

Eine rekombinante Expression und Aufreinigung der C-terminalen Domänen von rT1R1 und rT1R2, die jeweils mit einem N-terminalen in Bakterien biotinyliertem Protein, ppXa-P, fusioniert sind, konnte im prokaryontischen Pinpoint *Expression and Purification* System nicht durchgeführt werden. Eine native Solubilisierung der exprimierten Fusionsproteine war aufgrund der Einlagerung in sogenannte *Inclusion bodies* nicht möglich. Alternativ wurden die Sequenzen, die für die jeweiligen Fusionsproteine ppXa-P-rT1R1ct, ppXa-P-rT1R2ct sowie nur für das ppXa-P codieren, in den Vektor pSP64 umkloniert. Die übernommene, aus dem Vektor ppXa-3 stammende Sequenz des in Bakterien biotinylieren Proteins, ppXa-P, diente der Verlängerung der C-terminalen Domänen von rT1R1 und -2. Diese pSP64-Plasmidkonstrukte wurden zur gekoppelten *in vitro* Transkription/ Translation mit Hilfe eines Reticulocyten-Lysates eingesetzt, wobei die Transkription durch die SP6-RNA-Polymerase katalysiert wurde. Der Vektor pSP64 enthält stromabwärts der eingebauten Sequenz eine Poly(A)-Sequenz, durch die die Effektivität der Translation erhöht wird. Zur Kontrolle der Translation wurde die cDNA der Luciferase sowie H_2O eingesetzt. Durch die Zugabe von [^{35}S] markiertem Methionin, das während der Translation in die Proteine eingebaut wurde, konnten diese anhand ihrer radioaktiven Markierung visualisiert werden.

Die Fusionsproteine ppXa-P-rT1R1ct und ppXa-P-rT1R2ct, bestehend aus dem 133 Aminosäure umfassenden Protein ppXa-P und dem jeweiligen C-Terminus von rT1R1 (30 AS) sowie rT1R2 (28 AS), erscheinen als 18 kDa Banden (Abb. 19). Die bei 13 kDa darunter liegenden mit einem Δ versehenen Banden sind verkürzte Formen der Fusionsproteine ppXa-P-rT1R1ct und ppXa-P-rT1R2ct. Ein internes Methionin (AS 26) innerhalb der Proteinsequenz des ppXa-P könnte fälschlicherweise bei der Translation als Start-Methionin fungiert haben. PpXa-P allein erscheint als 13 kDa große Bande, die Luciferase als 57 kDa großes Protein.

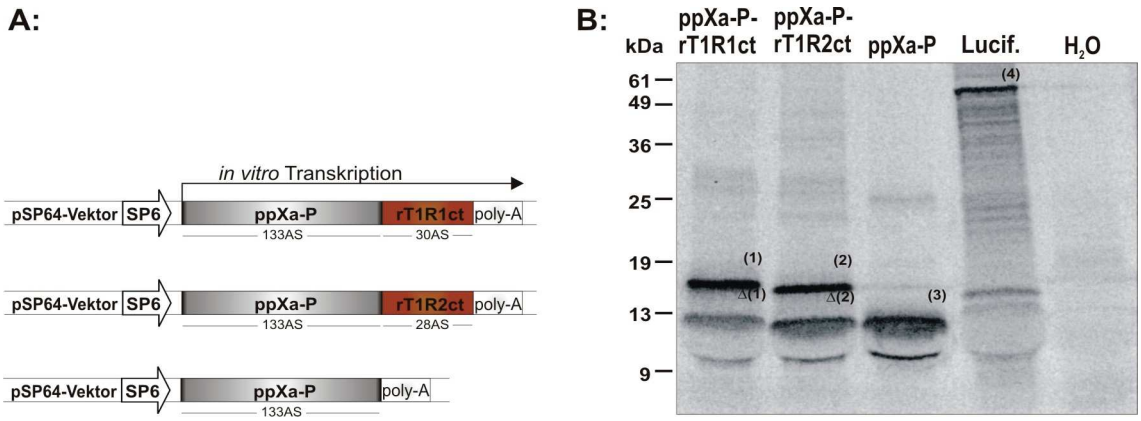


Abb. 19: *in vitro* translatierte Proteine
A: Schematische Darstellung der konstruierten Plasmide, die zur *in vitro* Transkription/ Translation der für den GST-*Pulldown Assay* (vgl. 3.2.6.3) eingesetzten Proteine verwendet wurden.
B: Zur Analyse der translatierten durch [^{35}S]-Methionin markierten Proteine wurden von jedem Ansatz 2 µl auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte nach Trocknen des Gels mit Hilfe des Phosphoimagers. Als Translationskontrollen wurden Ansätze mit H_2O und der Luciferase durchgeführt. (1) ppXa-P-rT1R1ct, Δ(1) ΔppXa-P-rT1R1ct, (2) ppXa-P-rT1R2ct, Δ(2) ΔppXa-P-rT1R2ct, (3) ppXa-P, (4) Luciferase

3.2.6.3 *Pulldown-Assay*

Um die Interaktion von rCIB und der C-terminalen Domäne des rT1R2 zu verifizieren, wurden aufgereinigtes, rekombinant exprimiertes GST-rCIB-HA und das *in vitro* translatierte ppXa-P-T1R2ct in einem Bindepuffer inkubiert. Durch Zugabe von Glutahion Sepharose *beads* kann im Fall einer Interaktion der Proteinkomplex über den GST-Anteil des Fusionsproteins gefällt werden. Findet keine Interaktion statt, wird lediglich das GST bzw. das GST-Fusionsprotein gefällt, nicht aber das *in vitro* translatierte Protein. Da es sich um Fusionsproteine handelt, muss zudem ausgeschlossen werden, dass die Proteine nicht über ihren Fusionspartner eine unspezifische Interaktion eingehen. Hierzu wurden zur Kontrolle die Ansätze III – VI mitgeführt, die ausschließen, dass die Interaktion über den GST- oder über den ppXa-P-Anteil vermittelt werden. Um die Spezifität in diesem System zu überprüfen, wurde zusätzlich das Fusionsprotein ppXa-P-T1R1ct als Negativkontrolle eingesetzt (I).

Wie die Abbildung 20 zeigt, werden in allen sechs Ansätzen die rekombinanten Proteine GST-rCIB-HA (I-III) und GST-Myc (IV-VI) in äquivalenten Mengen über die Glutathion-Sepharose präzipitiert. In dem Ansatz II wird zudem das *in vitro* translatierte Protein ppXa-P-rT1R2ct als Proteinkomplex mit dem GST-rCIB-HA über die Sepharose *beads* mit angereichert. Das Protein ppXa-P-rT1R1ct wird weder mit GST-rCIB-HA (II) noch mit GST-Myc (IV) gefällt. Durch die Kontrollen III, V und VI kann eine unspezifische Interaktion, vermittelt über den GST-Anteil oder über das N-terminal fusionierte Peptid, ausgeschlossen werden. Das *in vitro* translatierte Fusionsprotein ppXa-P-rT1R2 erscheint im Ausgangsmaterial in zwei Banden, die bei 13 und 18 kDa

in einem vergleichbaren Mengenverhältnis vorliegen (vgl. 3.2.6.2). Nach dem Bindungsansatz ist die 13 kDa große Bande im Verhältnis zu der 18 kDa großen Bande des ppXa-P-rT1R2ct angereichert und zeigt somit eine höhere Affinität zu GST-rCIB.

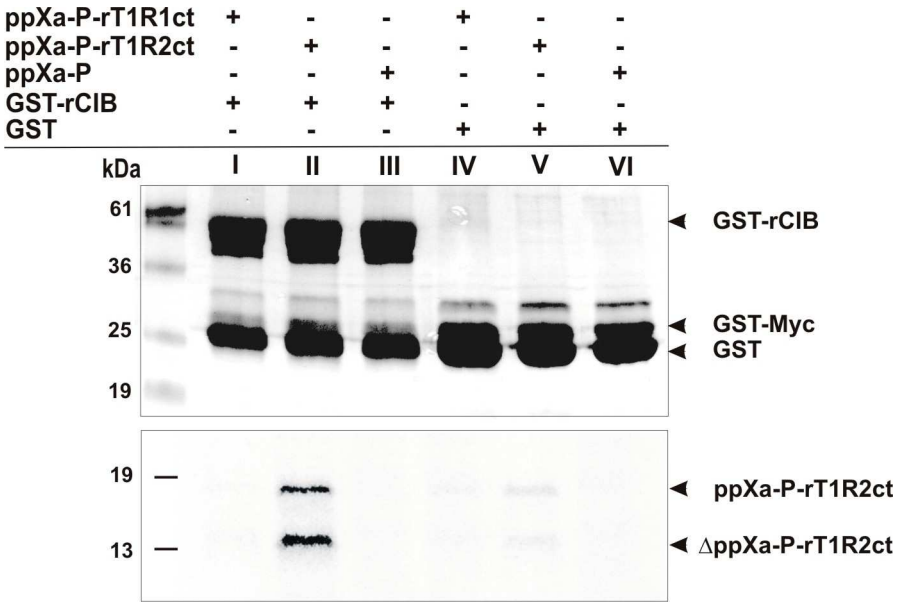


Abb. 20: *Pulldown-Assay* von GST-rCIB und GST mit jeweils ppXa-P-rT1R1, ppXa-P-rT1R2 und ppXa-P
Der mit der Glutathion Sepharose gefällte Proteinkomplex wurde in Laemmli aufgekocht und jeweils 10 µl der Proben auf zwei 15%ige SDS-Gele aufgetragen.
A: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Dokumentation von GST und GST-rCIB
B: Getrocknetes SDS-Gel zur Detektion der *in vitro* translatierten und in dem Assay gebundenen Proteine nach Auswertung auf dem Phosphoimager. Die im Assay eingesetzten Kombinationen: I GST-rCIB + ppXa-P-rT1R1ct, II GST-rCIB + ppXa-P-rT1R2ct, III GST-rCIB + ppXa-P, IV GST + ppXa-P-rT1R1ct, V GST + ppXa-P-rT1R2ct, VI GST + ppXa-P

Quantifizierung der Interaktion

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde dieser Interaktionstest mehrmals wiederholt. Die in dem Diagramm (Abb. 21) dargestellten Balken stellen den Mittelwert aus fünf unabhängig durchgeführten Versuchen dar.

Ein im Interaktionstest eingesetztes äqivalentes Volumen an *in vitro* translatiertem Protein wurde separat auf ein SDS-Gel zur Quantifizierung des eingesetzten Materials aufgetragen. Der Verlust an Radioaktivität innerhalb von 2-4 Tagen wurde aufgrund der Halbwertszeit von [^{35}S] nicht berücksichtigt. Die Proteinbanden wurden über das Software Programm Aida 3.1 quantifiziert und das Verhältnis von eingesetzter zur im Interaktionstest gebundenen Menge an *in vitro* translatiertem Protein gegenüber gestellt. Um die jeweilig unterschiedliche Anzahl der [^{35}S]-markierten Methionine in den translatierten Proteinen vernachlässigen zu können, wurde der jeweilige Input auf

100% gesetzt und die Menge an gebundenem Protein dementsprechend in % dargestellt.

Von ppXa-P-rT1R2ct haben in dem Assay 11% an rCIB gebunden. Die prozentualen Werte in den Ansätzen I und III-VI liegen zwischen 0,1 – 2% und sind somit signifikant geringer.

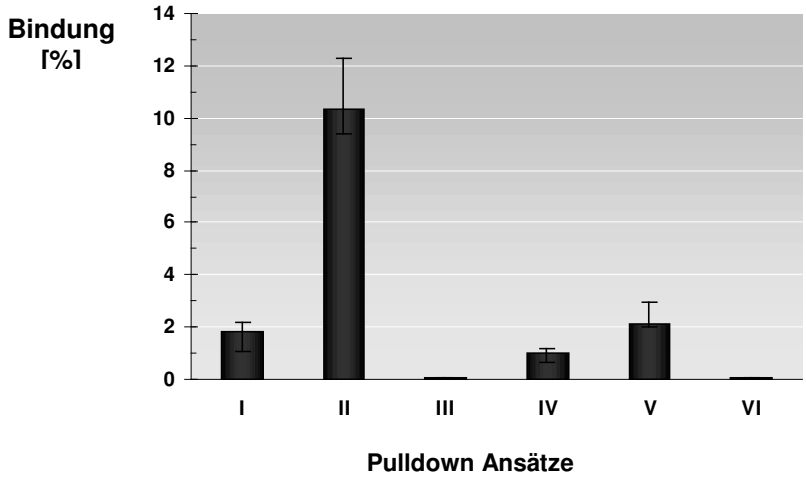


Abb. 21: Quantifizierung der gebundenen *in vitro* translatierten Proteine
Das Diagramm stellt die prozentuale Bindung der *in vitro* translatierten Proteine im Verhältnis zur eingesetzten Menge im Bindungs-*Assay* dar, wobei die relative Menge an Protein über das Software-Programm Aida 3.1 bestimmt wurde. Die im Assay eingesetzten Kombinationen: I GST-rCIB + ppXa-P-rT1R1ct, II GST-rCIB + ppXa-P-rT1R2ct, III GST-rCIB + ppXa-P, IV GST + ppXa-P-rT1R1ct, V GST + ppXa-P-rT1R2ct, VI GST + ppXa-P. Fehlerbalken stellen die Variationen von 5 unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

3.2.7 Co-Expression von rT1R2 und rCIB in HEK293-Zellen

Um weitere Hinweise zur Interaktion von rT1R2 und rCIB zu erhalten, wurde die Lokalisation der rekombinanten Proteine in HEK293-Zellen untersucht. rCIB besitzt eine Konsensus-Sequenz zur N-Myristoylierung. Diese co-translationale Modifizierung von Proteinen vermittelt eine Assoziation mit Membranen. Durch Myristoylierungs-Experimente im heterologen Zellsystem konnten Stabler, S:M. *et al.* (1999) die Myristoylierung des humanen CIB nachweisen, wobei N-terminale *tags* diese Modifizierung verhinderten.

Um diese Eigenschaft des rCIB-Proteins für die Co-Lokalisationsexperimente mit rT1R2 zu berücksichtigen, wurden die Expressionsvektoren FLAG-rCIB-pCMV und rCIB-FLAG-p3xFLAG-CMV14 eingesetzt, die für rCIB-Fusionsproteine codieren, bei denen rCIB zum einen am N-Terminus und zum anderen am C-Terminus mit einem FLAG-Epitop versehen ist. Dabei ist für das Fusionsprotein mit dem C-terminalen Epitop, rCIB-FLAG, die Myristoylierung zu erwarten, wobei diese für das Fusionsprotein mit dem N-terminalen Epitop, FLAG-rCIB, ausbleiben sollte. Da der Rezeptor rT1R2 in voller Länge weder nach transienter Transfektion in HEK293-Zellen

noch in einer stabil mit dem rT1R3 transfizierten Flp-In293-Zelllinie eindeutig an der Membran lokalisiert ist (Daten nicht gezeigt), wurde die rT1R2-Sequenz, die für die C-terminale Domäne codiert, zur Expression eines EGFP-rT1R2ct-Fusionsproteins in den Expressionsvektor pEGFP-N2 kloniert. Die Lokalisation der Proteine wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht, wobei EGFP-rT1R2ct über die Eigenfluoreszenz des GFPs und rCIB immuncytochemisch über das FLAG-Epitop mit einem primären anti-FLAG-Antikörper und einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper sichtbar gemacht wurden.

Erfolgte die Expression der rekombinanten Proteine unabhängig voneinander, zeigt das wahrscheinlich nicht myristoylierte FLAG-rCIB neben einer schwachen cytoplasmatischen Verteilung hauptsächlich eine Kernlokalisation, wobei die Nukleoli ausgespart sind. Das myristoylierte rCIB-FLAG ist ebenfalls im Kern, aber auch zu einem größeren Anteil im Cytoplasma lokalisiert. Zudem zeigt rCIB-FLAG in einigen Zellen eine Assoziation an die Plasmamembran. Das exprimierte EGFP-rT1R2ct-Fusionsprotein zeigt, ähnlich wie EGFP alleine, eine gleichmäßige Verteilung in der gesamten Zelle, zudem ist aber EGFP-rT1R2ct stark in einem Kompartiment der Zelle angereichert (Abb. 22 A).

Bei der Co-Expression des FLAG-CIB mit EGFP-rT1R2ct zeigt sich, dass FLAG-rCIB das Verhältnis von Kern- zu Cytoplasma-Lokalisation beibehält, dafür aber EGFP-rT1R2ct stärker im Zellkern vorkommt. Zusätzlich ist FLAG-rCIB in diesem mit EGFP-rT1R2ct angereicherten Kompartiment lokalisiert (B).

Für eine Co-Expression von rCIB-FLAG mit EGFP-rT1R2ct ist ähnliches zu beobachten, wobei rCIB-FLAG nicht in diesem Kompartiment, sondern vermutlich an dessen Membran assoziiert ist. Die von separat exprimierten rCIB-FLAG beobachtete Assoziation an die Plasmamembran kann im Fall einer Co-Expression mit EGFP-rT1R2ct nicht mehr festgestellt werden (C).

Die Co-Lokalisationsexperimente von rCIB und rT1R2ct zeigen, dass beide Proteine zu einem großen Anteil in HEK293-Zellen co-lokalisieren. Zusätzlich sind beide Fusionsproteine in einem Kompartiment angereichert, wobei die subzelluläre Verteilung von rCIB von dem Vorhandensein der Myristoylgruppe abhängig zu sein scheint.

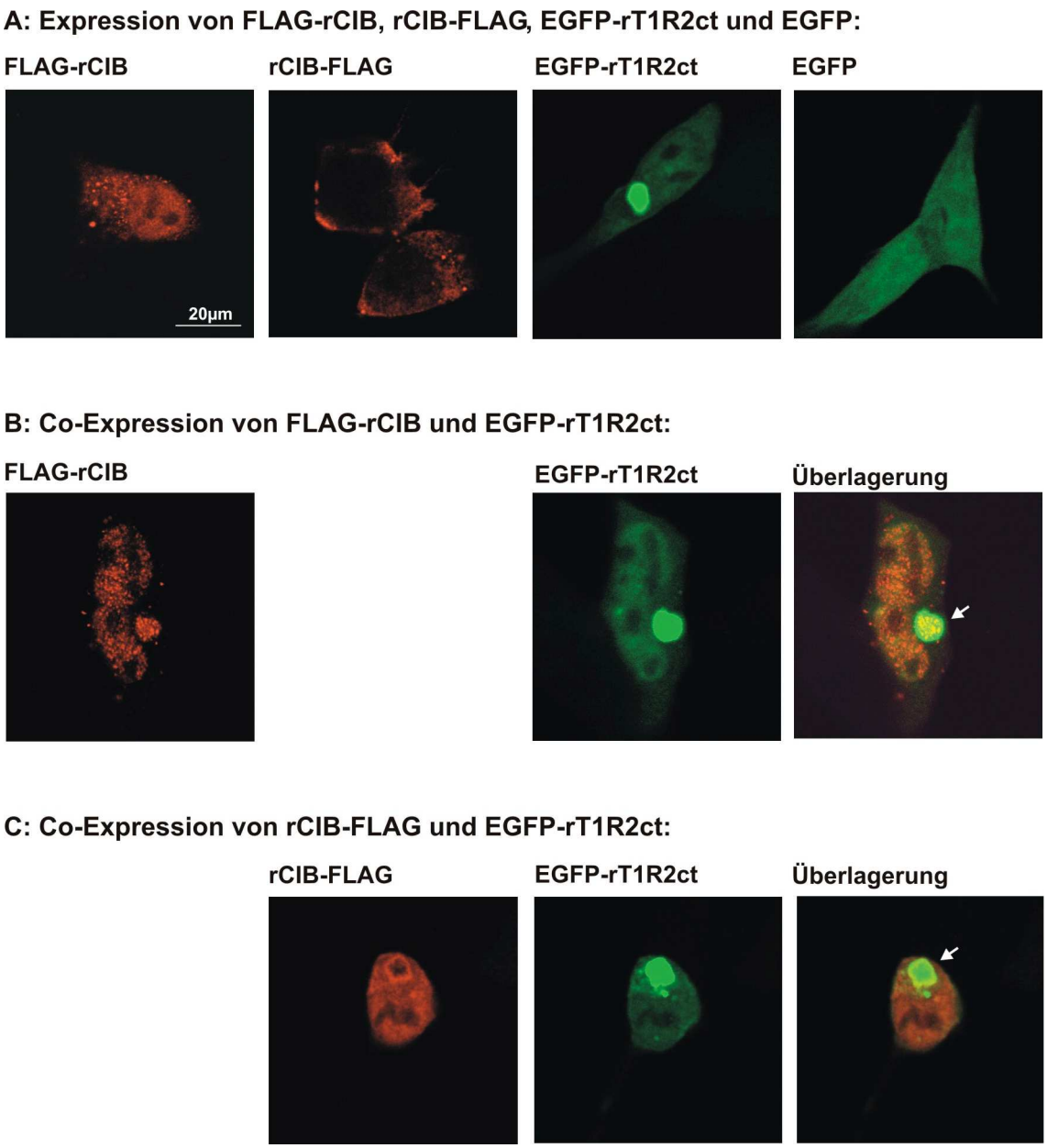


Abb. 22: Lokalisation von EGFP, EGFP-TR2ct, FLAG-rCIB und rCIB-FLAG in HEK293-Zellen
Die Lokalisierung der einzeln rekombinant exprimierten Proteine von EGFP, EGFP-TR2ct, FLAG-rCIB und rCIB-FLAG (A), die Co-Expression von FLAG-rCIB und EGFP-TR2ct (B) sowie die Co-Expression von rCIB-FLAG und EGFP-TR2ct (C) in HEK293-Zellen wurde immuncytochemisch analysiert und die Zellen in einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Die Lokalisation des Kompartimentes in der Nähe des Zellkerns, in dem EGFP-rT1R2ct und nach Co-Transfektion rCIB angereichert sind, weist auf den Golgi-Apparat hin. Um dies zu untersuchen, wurde der Golgi- und der TGN- (*trans*-Golgi-Netzwerk) Marker Golgin-97 immuncytochemisch mit einem anti-hGolgin-97-Antikörper und einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper detektiert. Hierfür wurden rCIB-FLAG und EGFP-rT1R2ct in HEK293-Zellen co-exprimiert und die Lokalisation der EGFP-rT1R2ct-Aggregate mit dem Golgin-97-Signal mittels Fluoreszenzmikroskopie

verglichen. Wie die Abbildung 23 zeigt, erfolgt die Anreicherung des EGFP-rT1R2ct-Fusionsproteins im Bereich des Golgi-Apparates, wobei nicht zwischen Golgi oder TGN differenziert werden kann.

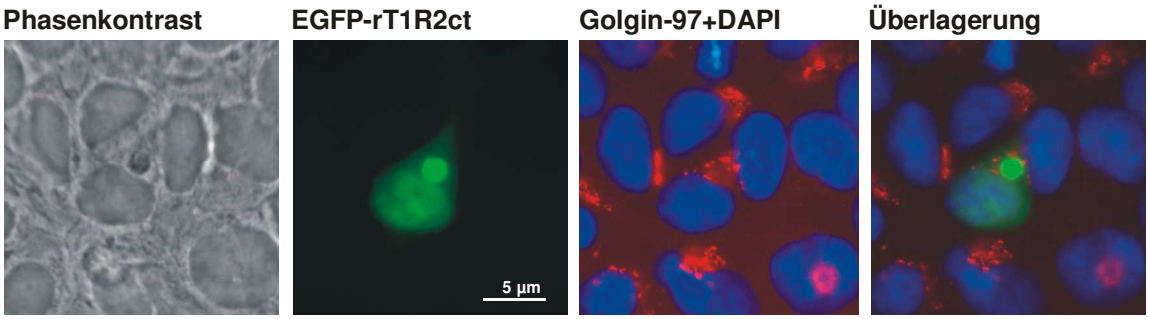


Abb. 23: Lokalisation von EGFP-rT1R2ct mit dem Golgi-Apparat in HEK293-Zellen
Dargestellt sind exprimiertes EGFP-rT1R2ct, die immuncytochemische Markierung des Golgi mit einem primären anti-Golgin-97-Antikörper und einem sekundären Cy3-konjugierten Antikörper und der durch DAPI-Färbung markierte Zellkern. Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt.
a: Phasenkontrast-Aufnahme, b: EGFP-rT1R2ct (grün), c: Golgin-97 (rot) mit gefärbten Zellkern (blau), d: Überlagung der Fluoreszenzen von EGFP-rT1R2ct, Golgin-97, Zellkern

3.2.8 Co-Immunopräzipitation von rT1R2 und rCIB aus HEK293-Zellen

Um die Interaktion der rekombinanten Proteine rCIB und rT1R2 biochemisch durch Co-Immunopräzipitation nachzuweisen, wurde das Plasmid zur Expression des EGFP-rT1R2ct jeweils mit denen zur Expression von rCIB-FLAG und FLAG-rCIB in HEK293-Zellen co-transfiziert (vgl. 3.2.7). Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen nur mit dem Plasmid rT1R2ct-pEGFP zur Expression von EGFP-rT1R2ct transfiziert. Zur Herstellung der Zellextrakte wurden die Zellen 30 h nach der Transfektion in EDTA/ EGTA-haltigem Bindungspuffer lysiert. Vor der Zugabe des anti-FLAG-Antikörpers, der kovalent an Agarose gekoppelt ist, wurde zur Analyse des Ausgangsmaterials (*Inputs*, I) von jedem Zellextrakt ein Aliquot abgenommen. Nach 12 h Inkubation wurden die Proteinkomplexe über den an die Agarose gebundenen anti-FLAG-Antikörper präzipitiert. Die Analyse der Co-Immunopräzipitation erfolgte mittels Western Blot. Hierfür wurden äqivalente Mengen des Ausgangsmaterials (*Inputs*, I) des Überstandes (Ü) und des Präzipitates (P) auf zwei Gele aufgetragen, wobei ein Blot zur Detektion des EGFP-rT1R2ct mit einem anti-EGFP-Antikörper und ein weiterer zur Detektion des FLAG-rCIB und rCIB-FLAG mit einem anti-FLAG-Antikörper inkubiert wurde. Wie in Abbildung 24 dargestellt, kann EGFP-rT1R2ct sowohl mit FLAG-rCIB (A) als auch mit rCIB-FLAG (B) co-präzipitiert werden, wobei in der Kontrolle (C) EGFP-rT1R2ct nicht im Präzipitat nachweisbar ist. Die Proteinbande von rCIB liegt bei ~ 24 kDa und ist somit im Western Blot auf derselben Höhe wie die L-Kette des für die Präzipitation eingesetzten anti-FLAG-Antikörpers. Trotz der kovalenten Kopplung des Antikörpers

an die Agarose, wird diese durch Läemmli-Puffer abgelöst. Da rCIB im Ausgangsmaterial detektiert werden kann und rCIB über das FLAG-Epitop direkt präzipitiert wird, handelt es sich bei der 25 kDa Bande um eine Mischbande bestehend aus IgG und rCIB. Die Expression von EGFP-rT1R2ct in Ansatz B ist sehr schwach, so dass das Fusionsprotein nicht im Ausgangsmaterial, dafür aber angereichert im Präzipitat detektierbar ist.

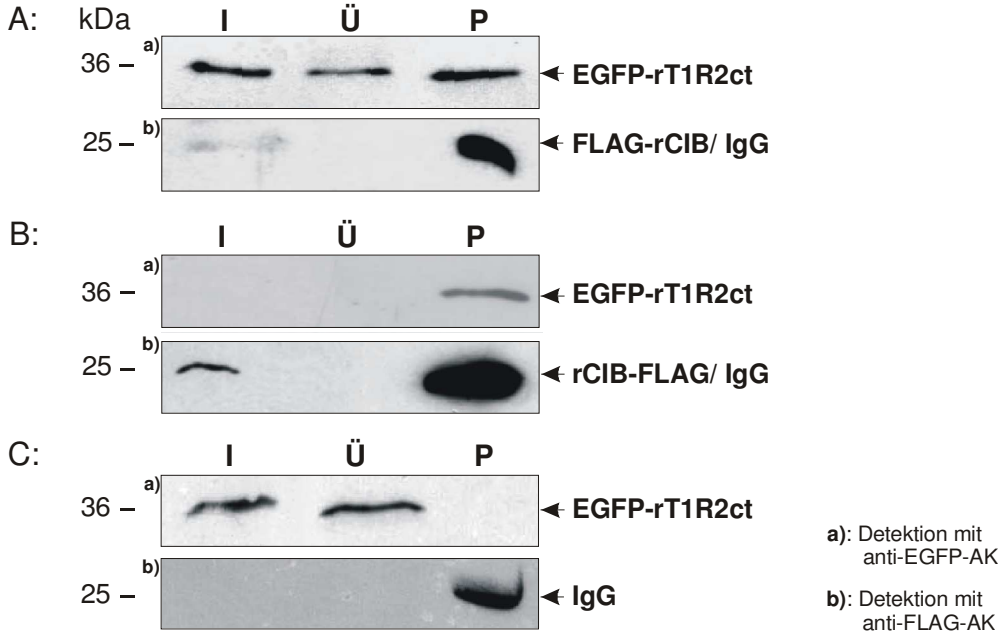


Abb. 24: Co-Immunopräzipitation (Co-IP) von FLAG-rCIB bzw. rCIB-FLAG und EGFP-rT1R2ct aus HEK293-Zellextrakt
Präzipitiert wurde mit einem anti-FLAG-Antikörper, der kovalent an Protein-A-Agarose gekoppelt war. Die rekombinanten Proteine rCIB-FLAG und FLAG-rCIB wurden mit einem anti-FLAG-Antikörper detektiert (b), rekombinantes EGFP-rT1R2ct wurde mit einem anti-EGFP-Antikörper detektiert (a).
A: Co-IP des Zellextraktes mit den rekombinanten Proteinen FLAG-rCIB und EGFP-T1R2ct.
B: Co-IP des Zellextraktes mit den rekombinanten Proteinen rCIB-FLAG und EGFP-T1R2ct.
C: Co-IP des Zellextraktes mit dem rekombinanten Protein EGFP-T1R2ct.
I: Input (Zellextrakt, der zur Co-IP eingesetzt wurde), Ü: Überstand (Zellextrakt bestehend aus den nicht an die mit anti-FLAG-Antikörper gekoppelte-Agarose gebundenen Proteine nach der Co-IP), P: Präzipitat (der über die anti-FLAG-Antikörper-Agarose gefällte Proteinextrakt).

Um den Einfluss von Ca^{2+} auf die Interaktion von rCIB und rT1R2 zu untersuchen, wurden in parallelen Ansätzen die transfizierten HEK293-Zellen vor der Zelllyse mit Ionomoycin behandelt und anschließend in einem Ca^{2+}-haltigem Bindepuffer inkubiert. Hierbei zeichnete sich nur eine geringfügig schwächere Affinität von rCIB zu rT1R2 ab (Daten nicht gezeigt), wobei aufgrund unterschiedlicher Mengen im Ausgangsmaterial im Vergleich zur Menge an co-präzipitiertem Protein bei den jeweiligen Co-IP-Ansätzen dieser beobachtete Effekt nicht eindeutig und signifikant war.

3.2.9 Subzelluläre Verteilung von rCIB in Abhängigkeit der N-Myristoylierung in HEK293-Zellen

Der Einfluss der Myristoylierung des rCIB-Proteins auf dessen subzelluläre Verteilung in HEK293-Zellen konnte zuvor in den Co-Lokalisationsexperimenten mit rT1R2ct beobachtet werden (vgl. 3.2.7). Inwieweit die intrazelluläre Konzentration an Ca^{2+} einen Einfluss auf die Lokalisation von rCIB ausübt, und welche Rolle dabei das Vorhandensein der Myristat-Gruppe spielt, wurde im heterologen Expressionssystem untersucht. Hierzu wurden die unter 3.2.7 beschriebenen Expressionsvektoren zur rekombinanten Expression der rCIB-Fusionsproteine, bei denen rCIB mit einem N- oder C-terminalen FLAG-Peptid versehen ist, in HEK293-Zellen transfiziert. Zu jeweils parallel durchgeführten Transfektionsansätzen wurde nach 24stündiger Expression Ionomycin (Calbiochem) in einer Endkonzentration von 8 µM zu den Zellen gegeben und diese für weitere 3 h inkubiert. Ionomycin bewirkt als Ca^{2+}-Ionophor den Transport von Ca^{2+}-Ionen durch Membranen und somit einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration. Die Lokalisation des rekombinanten rCIB wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 25).

FLAG-rCIB, das vermutlich keine Myristoylierung besitzt, ist hauptsächlich im Zellkern und schwach im Cytoplasma lokalisiert (121 Zellen), wobei durch die Ionomycin-Behandlung keine Veränderung der Lokalisation zu beobachten ist (Auszählung von 176 Zellen). Das myristoylierte rCIB-FLAG zeigt bei 165 von 487 mikroskopisch analysierten rCIB-FLAG-exprimierenden Zellen eine Assoziation mit der Plasmamembran, bei den restlichen Zellen ist rCIB-FLAG im Cytoplasma und im Kern lokalisiert. Durch die Behandlung von Ionomycin erhöht sich der Anteil an Zellen, bei denen CIB-FLAG an der Membran assoziiert vorliegt. Von 411 analysierten rCIB-FLAG positiven Zellen sind 320 membranassoziiert und lediglich 91 Zellen zeigen eine Verteilung von rCIB im Cytoplasma und im Kern. Einen Einfluss durch Ca^{2+} auf die subzelluläre Verteilung von rCIB in HEK293-Zellen kann nur für das rekombinante vermutlich myristoylierte Protein rCIB-FLAG, nicht aber für FLAG-rCIB beobachtet werden.

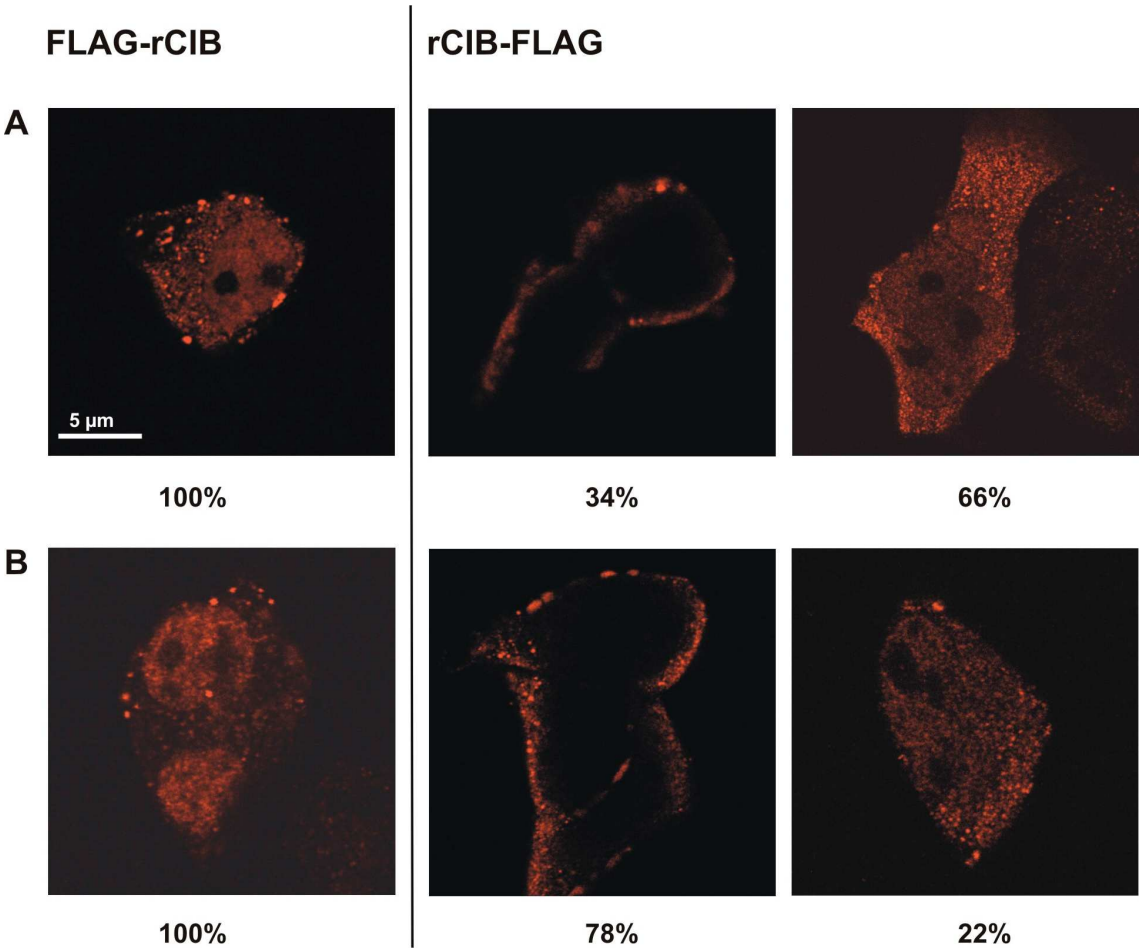


Abb. 25: Subzelluläre Verteilung von rCIB in Abhängigkeit der Myristoylierung und Ca^{2+}-Konzentration in HEK293-Zellen
Dargestellt sind HEK293-Zellen, die FLAG-CIB oder CIB-FLAG exprimieren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 3 h mit 8 µM Ionomycin inkubiert. A: ohne, B: mit Ionomycin. Aufgenommen wurden die Zellen mit einem konfokalem Fluoreszenzmikroskop. Die Anzahl an Zellen, die das dargestellte Expressionsmuster zeigen, ist in % angegeben.

3.2.10 Für die Interaktion mit rCIB essentielle Aminosäuren innerhalb des rT1R2

Eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit rCIB konnte nur mit dem rT1R2 aus der T1R Familie festgestellt werden. Die Identitäten der C-terminalen Domänen der drei Mitglieder der T1R-Familie aus der Ratte rT1R1,-2 und -3 liegen untereinander bei 45 - 50%. Ein Sequenzvergleich der drei Rezeptoren im Bereich des C-Terminus sollte Aufschluss über Aminosäuren geben, die sich im rT1R2 von denen im rT1R1 und rT1R3 unterscheiden (Abb. 26). Neben dem stark konservierten Bereich, der im Übergang der siebten TMR zu dem Beginn der C-terminalen Domäne liegt, zeigt der Sequenzvergleich noch zwei weitere konservierte Bereiche. Die vier Aminosäuren des rT1R2 Met_{818}, Arg_{825}, Ala_{829} und Met_{840} unterscheiden sich von denen innerhalb des rT1R1 und -3, deren Aminosäuren an diesen Stellen identisch sind. Die drei Aminosäuren Met_{818}, Arg_{825} und M_{840} liegen in den konservierten Bereichen innerhalb des Sequenzvergleiches.

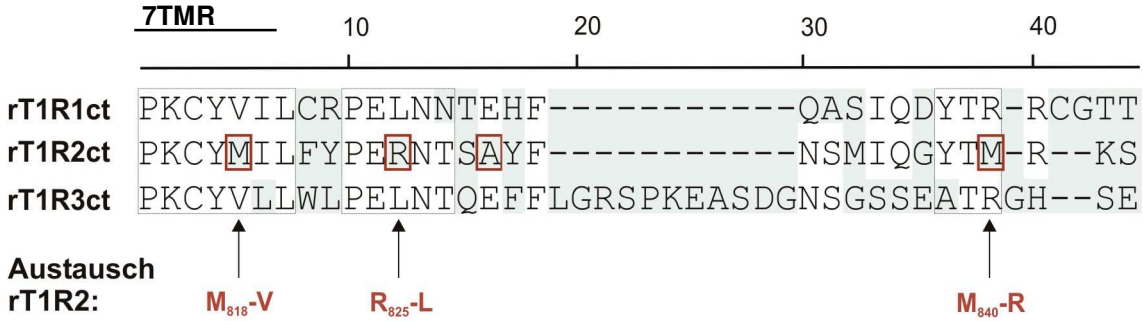


Abb. 26: Sequenzvergleich der C-terminalen Domänen der T1R-Mitglieder
Dargestellt ist der Sequenzvergleich der C-Termini von rT1R1, -2, -3. Die nicht konservierten Bereiche sind blau unterlegt. Die drei konservierten Boxen sind umrandet. Die Aminosäuren des rT1R2, die sich von rT1R1 und rT1R3 unterscheiden, aber in diesen beiden Rezeptoren gleich sind, sind mit einem roten Kasten umrandet. Diese Aminosäuren wurden durch die an derselben Stelle im rT1R1 und rT1R3 enthaltenen Aminosäure ersetzt.

Ob die Aminosäuren des rT1R2 innerhalb der konservierten Boxen, die sich von denen im rT1R1 und rT1R3 unterscheiden, essentiell für die Interaktion mit rCIB sind, wurde durch Mutagenese analysiert. Hierzu wurden die Aminosäuren Met_{818}, Arg_{825} und Met_{840} durch die im rT1R1 und -3 vorkommenden ersetzt, indem durch zielgerichtete Mutagenese die entsprechenden Nukleotide in der cDNA-Sequenz des rT1R2 verändert wurden. Als Ausgangsplasmid diente das Köderplasmid pGBKT7, das die für den C-Terminus von rT1R2 codierende cDNA-Sequenz enthält. Dabei wurden die Mutationen einzeln sowie in allen in Abbildung 27 dargestellten möglichen Kombinationen hinsichtlich der Fähigkeit zur Interaktion mit rCIB getestet. Die Transformanten mit rCIB und dem rT1R2ct, der die zu dem Austausch der Aminosäure

Met_{818} zu Val führende Mutation enthält, zeigten kein Wachstum auf den Selektionsplatten. Entsprechende Resultate ergaben sich auch mit den Hefe-Transformanten, die, zusätzlich zu dem Aminosäureaustausch Met_{818} zu Val, die von Met_{840} zu Arg und Arg_{825} zu Lys tragen. Ebenso zeigen diese Hefe-Transformanten eine drastisch reduzierte β-Galaktosidase-Aktivität. Die Mutationen Arg_{825} zu Lys und M_{840} zu Arg innerhalb des rT1R2ct haben keinen Einfluss auf die Interaktion mit rCIB und somit auf die Fähigkeit zum Wachstum auf den Selektionsplatten. Die β-Galaktosidase-Aktivität ist geringfügig niedriger im Vergleich zum Wildtyp.

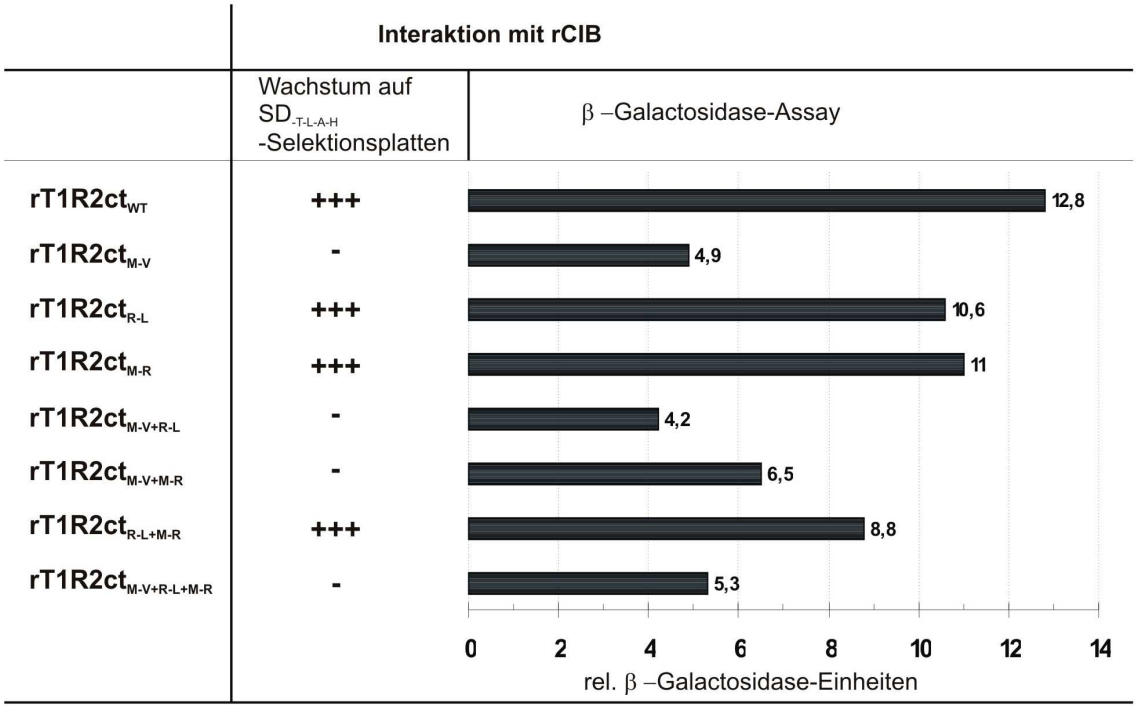


Abb. 27: Einfluss essentieller Aminosäuren im rT1R2ct auf die Fähigkeit zur Interaktion mit rCIB im Hefe Zwei-Hybrid-System
Dargestellt ist die Fähigkeit der Hefe-Transformanten von rCIB und rT1R2, der die aufgeführten veränderten Aminosäuren enthält, auf Selektionsmedium zu wachsen, sowie die Aktivität der β-Galaktosidase (dargestellt als Balkendiagramm). +++: Wachstum; -: kein Wachstum

3.2.11 Einfluss von rCIB auf die Liganden-vermittelte Aktivierung von rT1R2+3 im heterologen Expressionssystem

Eine funktionelle Rolle von rCIB bezüglich der Interaktion mit der C-terminalen Domäne von rT1R2 könnte zum einen im Bereich des Transportes innerhalb des *trans*-Golgi-Netzwerks liegen, zum anderen im Bereich der Signaltransduktion des heterodimeren Süß-Rezeptors rT1R2+3. Das humane CIB ist endogen in HEK293-Zellen vorhanden, was durch RT-PCR gezeigt werden konnte (vgl. 3.2.5.3). Da die Identitäten des Ratten zu dem humanen CIB bei 94% liegen und im Hefe-System rT1R2ct ebenfalls mit dem

humanen CIB interagiert, wurde in diesem Experiment mit dem endogenen, in HEK293-Zellen vorkommenden CIB gearbeitet. Die Transformationsexperimente im Hefesystem (vgl. 3.2.8) zeigten einen signifikanten Einfluss der Mutation $Met_{814} \rightarrow Val$ innerhalb des rT1R2ct auf die Interaktion mit rCIB. Um zu untersuchen, ob diese Protein-Protein-Wechselwirkung einen Einfluss auf die Signaltransduktion des rT1R2+3 ausübt, wurden Studien zur Liganden-vermittelten Aktivierung des heterodimeren Wildtyp-Süßrezeptors T1R2wt+3 und des mutierten Rezeptors rT1R2Mut+3, wobei der rT1R2 den Aminosäureaustausch $Met_{814} \rightarrow Val$ trägt, durchgeführt. Hierfür wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof (DifE, Potsdam) mit Hilfe eines FLIPRs™ (*Fluoromatric Imaging Plate Reader*) die Aktivierung des rT1R2wt+3 mit der des rT1R2Mut+3 verglichen, indem Dosis-Wirkungs-Kurven für den Liganden Acesulfam K erstellt wurden. Das Prinzip ist in der Abbildung 28 schematisch dargestellt.

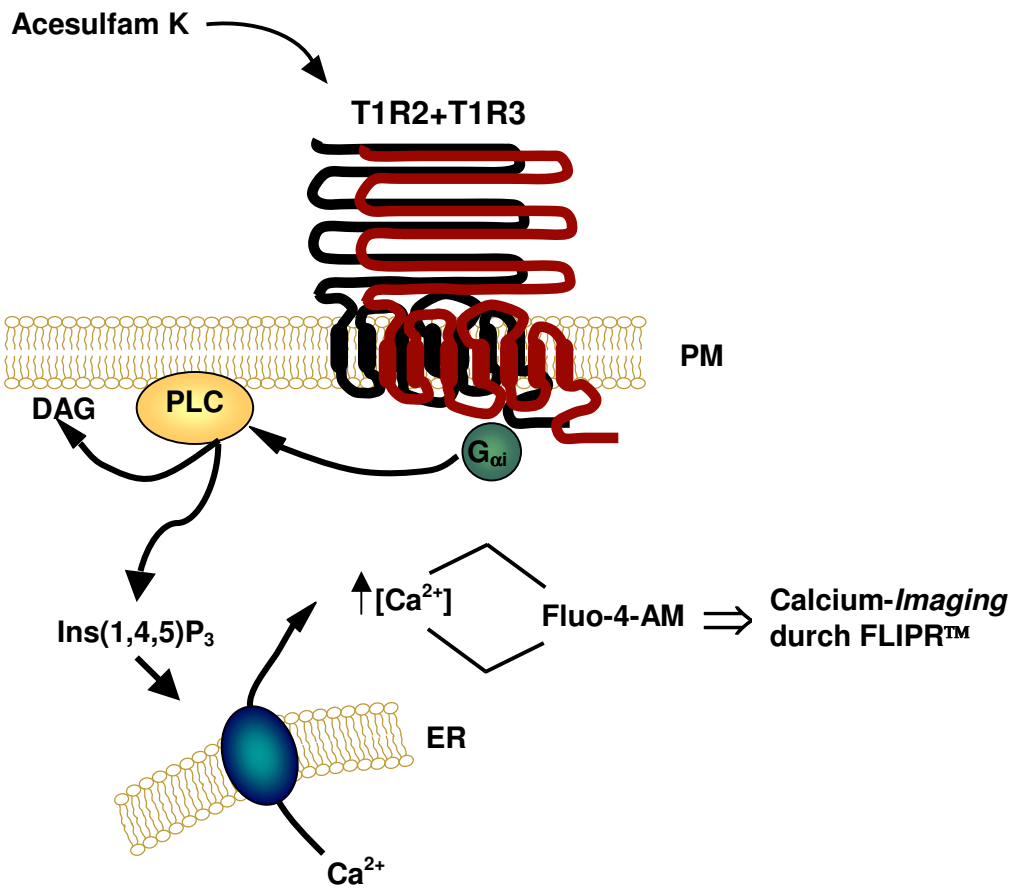


Abb. 28: Schematische Darstellung des Signalweges von rT1R2+3 nach Liganden vermittelter Aktivierung im heterologen Expressionssystem
Dargestellt ist der heterodimere Süßrezeptor rT1R2+3 sowie die an der Signaltransduktion beteiligten Moleküle $G_{i\alpha3mod.}$, PLC, $Ins(1,4,5)P_3$. Das freigesetzte Ca^{2+} bildet mit dem Fluorochrom einen Chelatkomplex aus, der über den FLIPR quantifiziert wird.

Die durch den Liganden Acesulfam K vermittelte Stimulierung des Rezeptors rT1R2+3 führt nach Aktivierung eines modifizierten G-Proteins $G_{i\alpha3mod.}$ zur Generierung von Ins(1,4,5)P_3 durch PLC und zur Freisetzung von Ca^{2+} in der Zelle. Die Ca^{2+}-Ionen bilden mit den Fluorochrom Fluo-AM-4 einen Komplex aus, der über die FLIPR-Apparatur quantifiziert werden kann.

Für die Calcium *Imaging*-Experimente wurde eine von Marcell Winnig (DifE, Potsdam) hergestellte stabile Flp-In-293-Zelllinie zur Transfektion von rT1R2wt oder rT1R2Mut verwendet, die den rT1R3 konventionell, und das G-Protein, über die Flp-In Rekombinase-Stelle, stabil exprimieren. Dreißig h nach der Transfektion wurden die Zellen für die Messungen eingesetzt, wobei drei parallele Versuche durchgeführt wurden. Um eine Dosis-Wirkungs-Kurve von Acesulfam K einschließlich der Standardabweichung aufzeichnen zu können, wurden den Zellen Acesulfam K in den Konzentrationen 0, 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 mM appliziert. Die Aktivierung des Rezeptors wurde nach Komplexausbildung von Ca^{2+} mit dem Farbstoff Fluo-4-AM mit Hilfe der FLIPR-Software quantifiziert. Zudem wurde den Zellen ATP zur Aktivierung eines endogenen purinergen Rezeptors appliziert, um Variationen der Zellzahl sowie die Responsivität der Zellen zu kontrollieren und bei der Auswertung mit zu berücksichtigen. Dieses ATP-Signal wurde mit dem Acesulfam K-Signal abgeglichen.

Das maximal gemessene Signal nach Liganden-Zugabe wurde auf 100% gesetzt und die weiteren Messdaten der unterschiedlichen Konzentrationen in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

Wie in Abbildung 29 zu sehen ist erreicht der Rezeptor rT1R2Mut+3 die maximale Aktivierung bei einer geringeren Konzentration Acesulfam K im Vergleich zum Wildtyp. Noch deutlicher sind die Unterschiede der Acesulfam K-Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung (EC_{50}): Der Rezeptor rT1R2wt+3 hat einen EC_{50}-Wert, der bei einer Acesulfam K Konzentration von 1,8 mM liegt. Der Rezeptor rT1R2Mut+3 hat einen niedrigeren EC_{50}-Wert von 0,9 mM Acesulfam K. Das zeigt, dass der mutierte Rezeptor eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Liganden Acesulfam K aufweist.

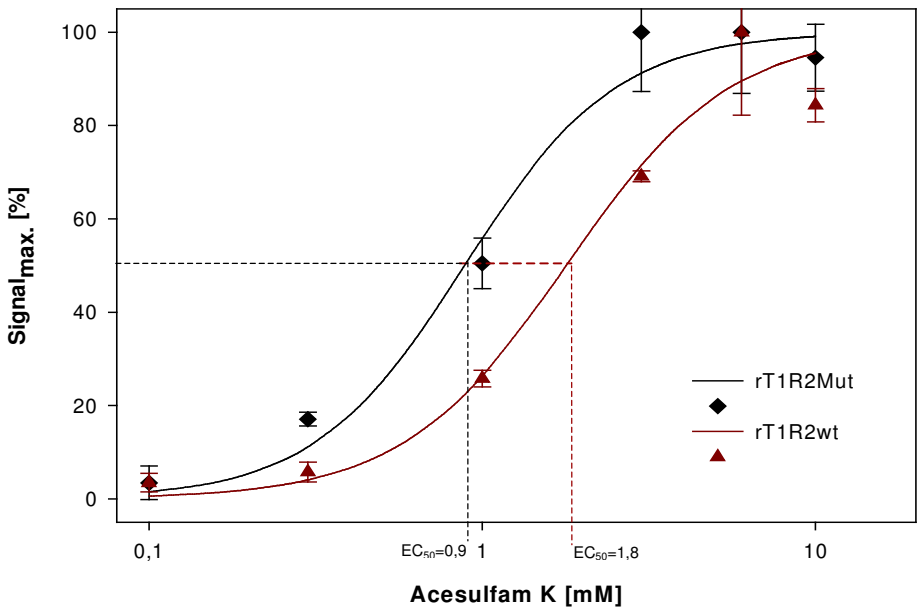


Abb. 29: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von rT1R2wt +3 und rT1R2Mut +3
Dargestellt ist die Dosis-Wirkung-Kurve für rT1R2wt+3 (rot, Datenpunkte rote Triangeln) im Vergleich zu der von rT1R2Mut+3 (schwarz, Datenpunkte schwarze Karos) mit dem Liganden Acesulfam K. Die Messpunkte sind nach Ligandenzugabe in den Konzentrationen 0,1, 0,3, 1, 3 und 10 erfasst.
EC_{50} (rT1R2wt+3): 1,8; EC_{50} (rT1R2Mut+3): 0,9

4. Diskussion

4.1 Einordnung von rTRX in die Geschmacksrezeptorfamilie T1R

Für die Mitglieder der T1R-Familie wird aufgrund ihrer Expression im Geschmacksgewebe und durch Studien zur Liganden-vermittelten Rezeptoraktivierung im heterologen Zellsystem von HEK293-Zellen die Ausbildung von Heterodimeren in den Kombinationen T1R1+T1R3 und T1R2+T1R3 postuliert (Nelson, G. *et al.*, 2001; Li, X. *et al.*, 2001). Dabei wird der T1R1+3 von Nagetieren durch die meisten der 20 Standard-L-Aminosäuren, nicht aber ihrer D-Enantiomere, aktiviert (Nelson, G. *et al.*, 2002). Für den humanen T1R1+3 kann nur die Aktivierung durch L-Glutamat beobachtet werden, wobei 5'-Ribonukleotide wie IMP oder GMP die Sensitivität für L-Glutamat steigern (Li, X. *et al.*, 2002). Der Rezeptor T1R2+3 wird durch mehrere Zucker, künstliche Süßstoffe sowie durch einige süße D-Aminosäuren aktiviert. Dieser zeigt aber sowohl bei Nagern als auch beim Menschen für einige Mono- und Disaccharide wie Glucose, Maltose und Lactose sowie für den künstlichen Süßstoff Aspartam nur eine geringe Aktivierung (Nelson, G. *et al.* 2001; Li, X. *et al.*, 2002). Eine durch Liganden-vermittelte Aktivierung der separat exprimierten Rezeptoren im heterologen Zellsystem konnte für den T1R1, T1R2 und den T1R3 nicht nachgewiesen werden (Nelson, G. *et al.*, 2001).

Untersuchungen zur Expression im chemosensorischen Gewebe zeigen, dass die Rezeptoren T1R1 bzw. T1R2 jeweils mit dem T1R3 in den Geschmackssinneszellen co-exprimiert sind. Der T1R3 hingegen kommt in den Geschmacksknospen des Geschmacksstreifens und in denen der fungiformen Papillen auch allein vor (Nelson, G. *et al.*, 2001). Für den T1R3 alleine konnte zwar bisher im Zellkultursystem keine Funktion als Süßrezeptor nachgewiesen werden, dennoch ist in den Sinneszellen für den T1R3 die Ausbildung eines Homodimers, das *in vivo* als Rezeptor fungiert, nicht ausgeschlossen. Ebenso denkbar ist die Existenz eines weiteren bisher nicht identifizierten Rezeptors, der in diesen T1R3-positiven Zellen exprimiert wird und der neben den Rezeptoren T1R1+3 und T1R2+3 einen dritten heterodimeren Rezeptor mit dem T1R3 ausbildet. Dieser könnte durch die Süß-Liganden aktiviert werden, die nur eine minimale Aktivierung des Rezeptors T1R2+3 bewirken.

4.1.1 Sequenzanalyse des rTRX

Von Sainz, E. *et al.* (2001) und Nelson, G. *et al.* (2001) konnte durch Datenbankanalysen neben T1R3 zu dem Zeitpunkt keine weiteren Rezeptoren identifiziert werden, die Ähnlichkeiten zu den Mitgliedern der T1R-Familie aufweisen. Dennoch führte eine von uns durchgeführte Datenbankanalyse zur Identifizierung eines neuen GPCR, den TRX, der neben den Rezeptoren T1R1 und T1R3 die höchsten Aminosäure (AS)-Identitäten zu dem T1R2 aufweist.

TRX kann ebenso wie die T1R-Mitglieder in die Gruppe C der GPCRs eingeordnet werden, die sich durch einen sehr langen extrazellulären N-Terminus auszeichnen und die signifikante Sequenzähnlichkeiten zu periplasmatischen Aminosäure-Bindeproteinen aus Bakterien aufzeigen (Olah, G.A. *et al.*, 1993)

Die AS-Identitäten des rTRX liegen für die T1R-Mitglieder aus der Ratte bei 29-31%. Vergleichbar geringe Identitäten liegen auch für die T1Rs untereinander vor. So hat rT1R3 eine AS-Identität zu rT1R1 von 34% und zu rT1R2 von 32%. Der rT1R1 zeigt zu rT1R2 eine etwas höhere Identität von 39% auf.

Auffällig sind die relativ geringen Identitäten zwischen den Geschmacksrezeptoren aus Ratte und Maus zu dem jeweiligen humanen Ortholog, die für T1R1 bei 73%, für T1R2 bei 69% und für T1R3 bei 72% liegen. Diese Sequenzunterschiede spiegeln sich auch in dem Spektrum an Liganden wieder, das zwischen Mensch und Nagern variiert. So zeigt der T1R2+3 der Maus keine Affinität zu den künstlichen Süßstoffen Aspartam, Cyclamat, Monellin und Neotam, wohingegen der humane T1R2+3 durch diese Liganden aktiviert wird. Vergleichbares trifft auch für den T1R1+3 zu, wobei der humane T1R1+3 durch L-Glutamat, nicht aber durch weitere L-Aminosäuren aktiviert wird, wie es für den murinen T1R1+3 beschrieben ist (Nelson, G. *et al.* 2001; Li, X. *et al.*, 2002).

Diese Besonderheit beruht möglicherweise auf einer im Laufe der phylogenetischen Entwicklung erfolgten Anpassung der unterschiedlichen Spezies an das Nahrungsangebot (Bufe, B. *et al.*, 2002). Der humane TRX zeigt ebenfalls zu seinen orthologen Rezeptoren aus der Ratte und der Maus nur verhältnismäßig geringe Identitäten auf Aminosäureebene auf, die bei 79% liegen. Dies spricht dafür, dass auch für rTRX die noch unbekannten Liganden zwischen den Spezies variieren. Für andere GPCRs aus der Subgruppe C, wie dem CaSR oder dem metabotropen Glutamat-Rezeptor, mGluR1, deren Liganden gleichbleibend konserviert und unabhängig von Spezies und phylogenetischer Entwicklung sind, liegen die Identitäten über 90% (Tabelle 9).

Spezies-Vergleich	T1R1	T1R2	T1R3	TRX	CaSR	mGluR1
Mensch-Maus	73,2	68,7	71,8	79,8	93,4	93,6
Mensch-Ratte	73,9	70,3	72,1	78,8	93,3	93,7
Ratte-Maus	89,8	91	92,8	93,2	98	98,3

Tab. 9: Sequenzvergleich der orthologen Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte
Aufgeführt ist jeweils ein Interspezies-Vergleich auf Aminosäureebene der Rezeptoren der T1R-Familie, T1R1, T1R2 und T1R3, des TRX sowie exemplarisch des mGluR1 und des CaSR.

Genetische Studien an Mäusen haben eine Reihe von Loci identifiziert, die im Zusammenhang mit Geschmacksperzeption stehen (Warren, R.P. & Lewis, R.C., 1970). Die Gene der Rezeptoren T1R1, -2 und -3 befinden sich als Cluster am distalen Ende des Chromosoms 4 der Maus, wobei das Gen für T1R3 im *Sac*-Locus liegt. Bei der Ratte liegen diese als Cluster auf Chromosom 5 und beim Menschen auf Chromosom 1. Diese Bereiche sind syntän zu der Region auf Chromosom 4 der Maus. Das Gen für TRX liegt nicht in diesem Cluster. Er kommt beim Menschen auf Chromosom 6, bei der Maus auf Chromosom 10 und bei der Ratte auf Chromosom 20 vor. Es liegt somit keine räumliche Nähe zu den bisher bekannten Genen der T1R-Familie vor. Die Gene der Rezeptoren der T2R-Familie liegen bei Mensch, Ratte und Maus ebenfalls in Clustern auf mehreren Chromosomen vor (Adler, E. *et al.*, 2000). Dabei kommt es aber auch vor, dass ein Bitter-Rezeptorgen aus dieser Familie nicht in einem Cluster, sondern, wie es auch für den TRX zutreffen könnte, separat auf einem anderen Chromosomabschnitt oder Chromosom vorliegt.

4.1.2 Expressionsmuster des rTRX im chemosensorischen Gewebe

Die höchsten Identitäten zu rTRX weist ein aus dem Goldfisch identifizierter Geruchs-Rezeptor caOR5.24 mit 48% auf. Dieser konnte durch Studien zur Liganden-vermittelten Rezeptoraktivierung im Expressionssystem von *Xenopus*-Oocyten als Rezeptor identifiziert werden, der durch Aminosäuren mit basischen Seitenketten, wie L-Arginin und L-Lysin, aktiviert wird (Speca, D.J. *et al.*, 1999). Northern Blot-Analysen mit Geweben des Goldfisches zeigen, dass caOR5.24 neben dem olfaktorischen Epithel, den Kiemen und Lippen auch auf der Zunge und dem Gaumen exprimiert wird. Gewebe des Gehirns, der Niere, der Leber, des Muskels, der Ovarien, des Darms und der Haut zeigten keine Signale (Speca, D.J. *et al.*, 1999). Um die Möglichkeit zu untersuchen, ob es sich bei dem caOR5.24 um einen Geschmacksrezeptor handelt, wurden von den Autoren *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, um die Expression des caOR5.24 in den Kiemen, die auch Geschmacksknospen enthalten, zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser nicht in den Geschmacksknospen, sondern

in Epithelzellen exprimiert wird. Eine Expression im Zungenepithel wird auch für einige andere Geruchs-Rezeptoren beschrieben (Abe, K. *et al.*, 1993).

Die Ergebnisse der RT-PCR (vgl. 3.1.3.1) zur Untersuchung der Expression des rTRX in Rattengewebe zeigen eindeutige Signale im Geschmacksstreifen sowie schwächere in den circumvallaten und foliaten Papillen. Nicht stetig reproduzierbare schwache Signale konnten auch im Zungenepithel, olfaktorischem Epithel sowie der Niere beobachtet werden. Weiterhin konnten, ähnlich wie für den caOR5.24 durch die Northern Blot-Analysen beschrieben, keine Signale in Muskel, Gehirn sowie Herz detektiert werden. Die cDNA des rTRX konnte damit deutlich aus Geschmacksgewebe, aber nur schwach aus dem olfaktorischen Epithel amplifiziert werden, was dafür spricht, dass es sich bei rTRX nicht, wie man durch die hohen AS-Identitäten zu dem caOR5.24 vermuten könnte, um einen Geruchs-Rezeptor handelt.

Sollte TRX ähnliche Liganden wie caOR5.24 binden, käme er bei landlebenden Tieren nicht als Geruchs-Rezeptor in Frage, da nur Fische gelöste Substanzen riechen und schmecken können.

Wenn es sich bei dem rTRX um den dritten Rezeptor handeln sollte, der mit dem T1R3 einen Heterodimer ausbildet, sollte dieser in den Papillen stark exprimiert werden, in denen T1R3 nur allein detektiert werden konnte, also im Geschmacksstreifen sowie in den fungiformen Papillen (Abb. 30). Tatsächlich konnte durch die RT-PCR das reproduzierbar stärkste Amplifikat des rTRX im Geschmacksstreifen detektiert werden. Allerdings konnte aus der cDNA fungiformer Papillen die cDNA des rTRX nicht amplifiziert werden. Diese Papillen, die nur jeweils eine Geschmacksknospe enthalten, liegen im vorderen Bereich der Zunge im Epithel verteilt. Da sie aufgrund ihrer Lage nur schwer von dem angrenzenden Zungenepithel separiert werden können, könnte bei einer ungenauen Präparation eine „Verdünnung“ durch Epithelgewebe die Ursache für eine nicht mögliche Amplifizierung des rTRX aus dieser cDNA sein.

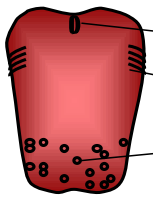
		rT1R1	rT1R2	rT1R3	rTRX
Gaumen	Geschmacksstreifen	+	+	+++	+++
	circumvallate Papille	+	+++	+++	+
	foliate Papille	+	+++	+++	+
	fungiforme Papille	+++	-	+++	/

Abb. 30: Verteilungsmuster der T1R-Mitglieder in den Geschmackspapillen
Aufgeführt sind die Rezeptoren rT1R1, -2 und -3 und deren Expressionsmuster in den circumvallaten, foliaten, fungiformen Papillen sowie in dem Geschmacksstreifen angegeben mit - (nicht), + (wenig), ++(mäßig), +++ (prominent) vorhanden. Dabei zeigt sich ein überlappendes Expressionsmuster von rT1R1 bzw. T1R2 jeweils mit dem T1R3 und möglicherweise eines weiteren Rezeptors.

Die Rezeptoren rT1R1, -2 und -3 konnten durch *in situ* Hybridisierungen in den Geschmackspapillen lokalisiert werden (Hoon, M.A. *et al.*, 1999; Nelson, G. *et al.*, 2001; Max, M. *et al.*, 2001; Montmayeur, J.-P. *et al.*, 2001; Kitagawa, M. *et al.*, 2001). Allerdings gibt es nur wenige Untersuchungen zur Expression der Rezeptoren in anderen Geweben. Für den rT1R3 aus der Maus wurden Northern Blot-Analysen durchgeführt, wobei die 7,8 kb große mRNA im Geschmacksgewebe nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich zeigt der Nothern Blot für Hoden und Gehirn Signale auf der Höhe von 7,6 kb. Eine weitere bei 6,7 kb liegende Bande kommt im Thymus vor (Max, M. *et al.*, 2001).

Die Suche nach Datenbanken-Einträgen für ESTs (*expressed sequence tag*) führte nur zu einem aus Kolon, was für eine spezifische Expression des T1R3 im Geschmacksgewebe spricht (Max, M. *et al.*, 2001). Auch für den TRX gibt es nur zwei EST-Einträge (für hTRX aus Niere), was ebenfalls auf eine Expression in einem Gewebe wie dem Geschmacksepithel schließen lässt, das in EST-Datanbanken nicht vertreten ist.

Zur genaueren Detektion des rTRX im Hinblick auf eine Co-Lokalisation mit dem T1R3 in den Geschmackspapillen wurden *in situ* Hybridisierungen durchgeführt, die zudem unabhängig von der Genauigkeit einer Gewebepräparation sind (vgl. 3.1.3.2). Dabei konnte allerdings rTRX weder in den Geschmacksknospen des Geschmacksstreifens, der circumvallaten Papille noch in dem angrenzenden Epithel lokalisiert werden.

Damit kann zwar für den rTRX durch die RT-PCR-Untersuchungen eine Co-Expression bzw. eine Co-Lokalisation mit dem rT1R3 im Geschmacksstreifen vermutet werden, aber ein direkter Nachweis, dass rTRX in den entsprechenden Geschmackssinneszellen mit dem T1R3 co-exprimiert ist, konnte nicht erbracht werden.

TRX ist anscheinend so schwach exprimiert, dass ein Nachweis über RT-PCR möglich ist, aber dieser nicht durch *in situ* Hybridisierung erfolgen kann.

4.1.4 Heterodimerisierung innerhalb der T1R-Familie

Die Besonderheit der T1R-Familie, die Ausbildung zu Heterodimeren, ermöglicht neben den Expressionsstudien von rTRX im Geschmacksgewebe einen weiteren Ansatz, seine Zugehörigkeit zu dieser Rezeptorfamilie zu untersuchen. Sollte rTRX zu dieser Familie gehören, ist ebenso für TRX wie für T1R1 und T1R2 eine Dimerisierung mit dem T1R3 zu erwarten. Hierzu wurden Bindungs- sowie Lokalisationsstudien im heterologen Zellsystem zur Untersuchung einer Wechselwirkung mit dem T1R3 durchgeführt.

Die separat in HEK293-Zellen exprimierten Rezeptoren rT1R2, rT1R3 und rTRX zeigen keine eindeutige Plasmamembranlokalisation. Während der rT1R2 und rTRX partiell an der PM lokalisiert sein könnten, ist der rT1R3 vermutlich am ER angereichert (vgl. 3.1.4.1). Eine ähnliche subzelluläre Verteilung wurde auch für die beiden Splicevarianten des $GABA_BR1a$ und -R1b beobachtet, die nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden, sondern im ER verbleiben (Couve, A. *et al.*, 1998). Der rekombinant exprimierte $GABA_BR2$ hingegen gelangt an die Zelloberfläche, zeigt aber nur eine geringe Aktivierung durch seinen Agonisten GABA.

Für die Rezeptoren $GABA_BR1$ und -R2 ist ähnlich wie für die T1R-Mitglieder die Heterodimerisierung zur Ausbildung eines funktionellen Rezeptors essentiell (Nelson, G. *et al.*, 2001; Lewcock, J.W. & Reed, R.R., 2001, Li, X. *et al.*, 2002; Grünewald, S. *et al.*, 2002). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wurde untersucht, ob die Ausbildung der Heterodimere innerhalb der T1R-Familie nach ähnlichem Mechanismus abläuft wie für die $GABA_B$-Rezeptoren.

Durch einen Hefe Zwei-Hybrid-Test mit dem C-Terminus des $GABA_BR1$ als Köder konnte der C-Terminus des $GABA_BR2$ als Interaktionspartner identifiziert werden (Kuner, R. *et al.*, 1999). Durch *Mapping*-Experimente konnten Bereiche innerhalb des $GABA_BR1$ (35 AS) und -R2 (32 AS) eingegrenzt werden, die die Interaktion vermitteln. Untersuchungen mit rekombinant exprimierten Peptiden aus den C-terminalen Domänen haben gezeigt, dass diese eine parallele coiled-coil α-Helix ausbilden (Kammerer, R.A. *et al.*, 1999).

Inwieweit eine Interaktion zwischen den C-terminalen Domänen des rT1R3 jeweils mit rT1R1, rT1R2 und rTRX stattfindet, wurde in dieser Arbeit im Hefe-System getestet. Dabei konnte keine Interaktion beobachtet werden. Die C-Termini der jeweiligen monomeren Rezeptoren verfügen nicht über eine α-Helix, über die bei Dimerisierung eine parallele coiled-coil α-Helix-Struktur ausgebildet werden kann.

Der $GABA_BR1$ wird aufgrund eines ER-Retentionssignals [RXR(R)], im ER zurück gehalten (Margeta-Mitrovic, M. *et al.*, 2000). Durch die Co-Expression des $GABA_BR1a$ mit dem $GABA_BR2$ konnte im heterologen Zellsystem die Oberflächenexpression beider Rezeptoren erreicht werden, da die Interaktion mit dem -R2 das ER-Retentionssignals am C-Terminus des -R1 maskiert (White, J.H. *et al.*, 1998; Margeta-Mitrovic, M. *et al.*, 2000). Die Lokalisation des rT1R3 am ER beruht nicht auf dem Vorhandensein eines solchen Motives, auch über Datenbank-Analysen konnte kein vergleichbares ER-Retentionssignal ausfindig gemacht werden.

Eine Co-Expression in HEK293-Zellen von rT1R2 und rTRX jeweils mit rT1R3 führte nicht zu einer korrekten Zielsteuerung der Rezeptoren an die Plasmamembran. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Gegenwart von Glucose und der im

Serum befindlichen Zucker und Aminosäuren zu einer Desensitisierung und einer Internalisierung der Rezeptoren führen kann, wurden die Experimente in DMEM-Medium ohne Glucose und mit dialysiertem FCS durchgeführt. Doch auch unter diesen Bedingungen konnte keine erfolgreiche Oberflächenexpression dieser Rezeptor-Kombinationen erreicht werden. Es müssen also für die Rezeptoren der T1R-Familie weitere, bisher unbekannte Faktoren essentiell für eine Zelloberflächenexpression sein. Für olfaktorische Rezeptoren, die im heterologen Zellsystem im ER oder im Golgi-Apparat zurückgehalten werden, werden Chaperone vermutet, die in olfaktorischen Neuronen spezifisch exprimiert werden (Brady, A.E. & Limbird, L.E., 2001).

Eine Co-Expression führte nicht zum gleichen Ergebnis wie es für die $GABA_B$-Rezeptoren beschrieben ist. Vielmehr könnten an der Ausbildung der Heterodimere rT1R1+3 und rT1R2+3 und möglicherweise rTRX+rT1R3 konservierte Cysteine innerhalb einer Cystein-reichen Region in der extrazellulären Domäne in der Nähe der ersten TMD beteiligt sein. Mutationsanalysen für den mGluR1 haben gezeigt, dass hier Austausche von Cysteinen durch Alanine wesentlich den Status der Homodimerisierung beeinflussen (Tsuji, Y. *et al.*, 2000). Dabei vermittelt die Existenz von Disulfidbrücken vermutlich eine durch Ligandenbindung hervorgerufene Konformationsänderung der intermolekularen Interaktion, was auch für den CaSR (Ray, K. *et al.*, 1999) und den muscarinischen AChR M3 (Zeng, F.Y. 1999) gezeigt werden konnte. Diese Cystein-reiche Region kommt nicht in den $GABA_B$-Rezeptoren vor (Tsuji, Y. *et al.*, 2000). Ein Sequenzvergleich in diesem Bereich zeigt, dass auch der rTRX sowie die T1R-Mitglieder diese konservierten Cysteine enthalten (Abb. 31).

```
            610       620       630       640       650       660
544 GSYKKIGYYDSTKDDLSW-SKTDKWIGGS------------------------------ rGABA_BR1
433 SREVKVGEYNAVADTLEIINDTIRFQGSE------------------------------ rGABA_BR2
460 WTFEIIGSASLSPVHLDINKTKIQWHGKNNQVPVSVCTTDCLAGHHRVVVGS-HHCCFEC rT1R1
464 NPFQSIASYSPTSKRLTYIN-NVSWYTPNNTVPVSMCSKSCQPGQMKKSVGL-HPCCFEC rT1R2
473 PVLHTVGTFNGT---LQLQHSKMYW--PGNQVPVSQCSRQCKDGQVRRVKGF-HSCCYDC rT1R3
486 MTVTKMAEYDLQHDVFITTNQETKHEFRKLKQILSKCSKECIPGQMKKATGSQHSCCYEC rTRX
491 R-YDYVHVGTWHEGVLNIDDYKI--QMNKSGMVRSVCSEPCLKGQIKVIRKGEVSCCWIC rmGluR1

            670       680       690       700       710       720
592 ---------------------------PPADQTLVIKT-FRFLS--QKLFISVSVLSSLG rGABA_BR1
482 ---------------------------PPKDKTIILEQ-LRKIS--LPLYSILSALTILG rGABA_BR2
520 VPCEAGTFLNMSELHI-CQPCGTE-EWAPKESTTCFPRTVEFLAWHEPISLVLIAANTLL rT1R1
523 LDCMPGTYLNRSADEFNCLSCPGS-MWSYKNDITCFQRRPTFLEWHEVPTIVVAILAALG rT1R2
528 VDCKAGSY-RKHPDDFTCTPCGKD-QWSPEKSTTCLPRRPKFLAWGEPAVLSLLLLLCLV rT1R3
546 VNCPENHYSNETDMD-HCLVCNNETHWAPVRSTMCFEKEVEYLDWDDSLALLLIALSLLG rTRX
548 TACKENEFVQ---DEFTCRACDLG-WWPNAELTGCEPIPVRYLEWSDIESIIAIAFSCLG rmGluR1
                                                   1TMD
```

Abb. 31: Sequenzvergleich der Cystein-reichen Region des mGluR1 mit den T1R-Mitgliedern, dem rTRX und den $GABA_B$-Rezeptoren

Im Vergleich dargestellt sind jeweils die Ratten-Sequenzen des $GABA_BR1$ und -R2, rT1R1, -2 und -3, rTRX sowie der rmGluR1. Der Beginn der ersten Transmembranregion der Rezeptoren ist unterstrichen. Die in den konservierten Bereichen (grün unterlegt) liegenden Cysteine sind mit einem roten Sternchen versehen.

Die Wechselwirkung vieler GPCRs zur Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren kann biochemisch durch Co-Immunopräzipitationen nachgewiesen werden. Die Co-Expression der Rezeptoren ist dabei Voraussetzung, da die Dimerisierung im ER stattfindet und eine Co-Immunopräzipitation nicht mit separat exprimierten Rezeptoren erfolgen kann (Angers, S. *et al*., 2002).

Der Nachweis zur Homodimerisierung konnte für Dopamin-Rezeptor, mGluR5-, δ-Opioid-Rezeptor sowie CaSR und M3 muscarinischen AChR mit jeweils unterschiedlich Epitop-markierten rekombinant exprimierten Rezeptoren durch Co-Immunopräzipitation erfolgen. Ebenfalls konnte die Heterodimerisierung der Rezeptoren von $GABA_BR1$ mit -R2, δ-Opioid mit μ-Opioid, δ-Opioid mit κ-Opioid sowie SSTR3 mit SSTR2a nachgewiesen werden, um nur einige Beispiele zu nennen (Referenzen in Angers, S. *et al*., 2002).

Um zu untersuchen, ob eine Heterodimerisierung des rTRX mit dem rT1R3 stattfindet, möglicherweise vermittelt über den extrazellulären N-terminalen Bereich, wurden für die Interaktionstests die Rezeptoren in ihrer vollen Länge eingesetzt (vgl. 3.1.4.2). Zur Kontrolle diente dabei das Heterodimer T1R2+3. Die Interaktion des Maus T1R2 sowie des T1R1 mit jeweils dem T1R3 konnte durch Co-Immunopräzipitation (Co-IP) aus transient transfizierten HEK293-Zellen, die T1R1 und T1R3 bzw. T1R2 und T1R3 co-exprimierten, nachgewiesen werden (Nelson, G. *et al*, 2002). Dabei zeigte sich zudem, dass die Sequenzunterschiede der „Schmecker"- und „Nicht-Schmecker"-Mausstämme, die auf Polymorphismen innerhalb des T1R3-Gens beruhen, keinen Einfluss auf die Dimerisierung haben. Während die Western Blots von Nelson, G. *et al*. (2002) Banden auf der Höhe von 116 kDa für T1R3 zeigen, wurden in dieser Arbeit die Rezeptoren mit einem Molekulargewicht von ~180 kDa detektiert, die darauf schließen lassen, dass durch die reduzierenden Bedingungen des Probenpuffers die Dimerisierung nicht aufgehoben wird, wie dies auch für andere GPCR, z.B den mGluR8, zutrifft (Rosemond, E. *et al*., 2002). Die Dimerisierung kann somit nicht ausschließlich über Disulfidbrücken vermittelt durch die Cystein-reiche Region erfolgen. Auch für den rTRX konnte in diesen Experimenten eine Interaktion mit dem T1R3 nachgewiesen werden. Damit kann auch für rTRX wie für rT1R1 und rT1R2 die Ausbildung eines Heterodimers mit rT1R3 angenommen werden.

Sowohl die Expressions- und Sequenzanalysen als auch die Co-Immunopräzipitation weisen darauf hin, dass rTRX der vierte Rezeptor innerhalb der T1R-Familie sein könnte. Weitere Versuche wie z.B. die Liganden-vermittelte Aktivierung des Rezeptors rT1R3+rTRX und weitere Expressions-Analysen mit einem jetzt zur Verfügung stehenden Antikörper gegen rTRX sind notwendig, um die Zugehörigkeit in diese Rezeptorfamilie zu verifizieren.

4.2 Rolle der Interaktion von rCIB mit rT1R2 für den Süß-Geschmack

Die Bedeutung und Funktion von Proteinen, die mit C-terminalen Domänen von Rezeptoren interagieren, ist eingehend in der PSD (postsynaptischen Dichte) sowie im visuellen System von *Drosophila* beschrieben (Kreienkamp, H.-J. *et al.*, 2002; Huber, A., 2001).

Für das chemosensorische System sind bisher weder für die Bitter-Rezeptoren der Familie T2R noch für die Süß-Rezeptoren der Familie T1R Untersuchungen bekannt, die zur Identifizierung von Proteinen geführt haben, die mit den C-terminalen Domänen dieser Rezeptoren interagieren. Die in dieser Arbeit beschriebene Charakterisierung der Interaktion von rT1R2 mit rCIB stellt somit einen ersten Ansatz dar, um für das Geschmackssystem die Funktion und Wechselwirkungen von Proteinen zu untersuchen, die als Teil eines „Signalosoms“ in den Geschmackssinneszellen vorstellbar sind.

4.2.1 Expression von CIB in Geweben der Ratte

Die Identifizierung von CIB im Hefe Zwei-Hybrid-System aus einer humanen Keratinocyten-cDNA-Bank erforderte eine weitere Analyse der Expression von CIB im Rattengewebe. Durch Northern Blot-Analysen konnte für die Ratten CIB-mRNA eine ubiquitäre Verteilung festgestellt werden, wie sie ebenfalls für die humane und die murine CIB-mRNA in adultem sowie in embryonalem Gewebe beschrieben ist (Whitehouse, C. *et al.*, 2002; Shock, D.D. *et al.*, 1999; Stabler, S.M. *et al.*, 1999; Saito, T. *et al.*, 1999).

Eine detaillierte Analyse zur Expression im chemosensorischen Gewebe durch RT-PCR bestätigte die ubiquitäre Expression der rCIB-mRNA auch im olfaktorischen Epithel sowie im Geschmacksepithel der unterschiedlichen Papillen.

Allerdings konnte das Protein immunhistochemisch nicht eindeutig im Geschmacksgewebe nachgewiesen werden. Diese Schwierigkeit zur Detektion kann darin begründet sein, dass ein Signal für das CIB-Protein in definierten Regionen nicht erwartet werden kann. Ein schwaches Signal kann somit von unspezifischer Hintergrundfärbung schwer unterscheidbar sein, was zusätzlich durch eine unzulängliche Affinität und Spezifität des anti-hCIB-Antikörpers zu seinem Antigen noch verstärkt wird. Stabler, S.M. *et al.* (1999) beschreiben diese Schwierigkeit zur Detektion des endogenen CIB, was möglicherweise auf eine schnelle Degradation des Proteins zurückzuführen ist.

Der Nachweis einer Co-Lokalisation als Grundvoraussetzung einer Interaktion *in vivo* von rT1R2 mit rCIB in den Geschmacks-Rezeptorzellen der circumvallaten Papille der Ratte, in denen T1R2 hauptsächlich exprimiert wird, konnte somit mit Hilfe der

Immunhistochemie nicht erbracht werden. Dennoch ist aufgrund der ubiquitären Verteilung der rCIB-mRNA die Co-Expression beider Proteine in den Geschmacks-Rezeptorzellen mit rT1R2 wahrscheinlich.

4.2.2 Biochemischer Nachweis der Interaktion

Durch den *in vitro Pulldown-Assay* sowie durch die Co-Immunopräzipitation aus HEK293-Zellen konnte die Interaktion von rT1R2 und rCIB außerhalb des Hefe-Systems verifiziert werden. Dabei kann aufgrund der Resultate im *Pulldown-Assay*, für den das aufgereinigte GST-rCIB-Fusionsprotein und das separat *in vitro* translatierte Protein ppXa-P-rT1R2ct eingesetzt wurden, auf eine direkte Interaktion zwischen CIB und T1R2 geschlossen werden (vgl. 3.2.3.6). Die Co-Immunopräzipitation hat zudem gezeigt, dass die Myristoylierung des rCIB bezüglich der Wechselwirkung mit rT1R2 keine Rolle spielt (vgl. 3.2.8).

Für die Interaktion des humanen CIB mit dem C-Terminus der α-Untereinheit des Integrin-Rezeptors konnte in Gegenwart von Ca^{2+} eine höhere Affinität zwischen CIB und Integrin$\alpha_{IIb}\beta_3$ gezeigt werden (Tsuboi, S., 2002; Shock, D.D. *et al.*, 1999). Ein signifikanter Einfluss von Ca^{2+}-Ionen auf die Interaktion von rCIB und rT1R2 konnte nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist rCIB durch die jeweils N- oder C-terminale Epitop-Markierung in seiner Konformation verändert und zeigt dadurch auch nur geringere Sensibilität gegenüber Ca^{2+}-Ionen.

Auch für andere Interaktionspartner, abgesehen vom Integrin-Rezeptor, ist aus der Literatur für CIB keine Ca^{2+}-abhängige Interaktion bekannt.

Die für eine Interaktion mit CIB verantwortlichen Sequenzbereiche der bekannten Interaktionspartner wie Integrin$\alpha_{IIb}\beta_3$ (Naik, U.P. *et al.*, 1997); Presenilin 2 (Stabler, S.M. *et al.*, 1999), den *Polo-like* Kinasen Snk und Fnk (Kauselmann, G. *et al.*, 1999) und Rac3 (Haataja. L. *et al.*, 2002) sind nicht konserviert. Es konnte kein einheitliches Motiv identifiziert werden, über das generell eine Interaktion mit CIB vermittelt wird. Möglicherweise beruht die Fähigkeit von CIB, Wechselwirkungen mit unterschiedlichen Proteinen eingehen zu können, auf seiner strukturellen Plastizität, wie es ebenfalls für Calmodulin beschrieben ist (Haeseleer, F. *et al.*, 2002).

4.2.3 Spezifität der Interaktion von CIB und T1R2

Wie die Transformationsexperimente dieser Arbeit im Hefe-System gezeigt haben, kommt eine Wechselwirkung von rCIB nur mit dem rT1R2 und nicht mit den anderen Mitgliedern der T1R-Familie (rT1R1, -3 sowie dem rTRX) vor (vgl. 3.2.3). Ein ähnliches Phänomen kann auch für weitere bekannte Interaktionspartner des humanen CIB beobachtet werden.

So interagiert hCIB mit der kleinen GTPase Rac3, nicht aber mit den beiden weiteren humanen Isoformen Rac1 und Rac2, obwohl diese hohe Identität von 89-93% zu Rac3 aufweisen (Haataja, L. *et al.*, 2002).
Die mit der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung stehenden Proteine Presenilin 1 (PS1) und Presenilin 2 (PS2) sind Transmembranproteine, die ebenfalls eine hohe AS-Identität zueinander haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion mit hCIB von einer Region innerhalb der dritten intrazellulären Schleife des PS2 vermittelt wird. Obwohl PS1 sich innerhalb dieser Region nur durch drei AS von PS2 unterscheidet, zeigt CIB nur eine geringe Affinität zu PS1 (Stabler, S.M. *et al.*, 1999). Auch für die Interaktion des hCIB mit dem C-Terminus der α-Untereinheit des Integrin-Rezeptors $\alpha_{IIb}\beta_3$ konnte im Hefe Zwei-Hybrid-System eine spezifische Wechselwirkung mit Integrinα_{IIb} nachgewiesen werden, nicht aber mit anderen α-Untereinheiten, wie αv, α2, α5 (Naik, U.P. *et al.*, 1997).
Ein Sequenzvergleich der Rezeptoren der T1R-Familie führte nach Mutationsanalysen und Transformationsexperimenten im Hefe Zwei-Hybrid-System zur Identifizierung einer Aminosäure innerhalb des rT1R2, Met_{818}, die essentiell für die Interaktion mit rCIB ist (vgl. 3.2.10). Da diese AS konserviert ist in T1R2-Rezeptoren der Ratte, Maus und des Menschen, ist sie vermutlich ebenfalls unerlässlich für die Interaktion mit dem humanen und dem murinen CIB-Protein. Met_{818} ist umgeben von hydrophoben AS und liegt nach Vorhersagen der Transmembrantopologie des rT1R2 im Bereich des Übergangs zwischen der siebten Transmembranregion und dem intrazellulären C-Terminus.
Ähnliches konnte für die Interaktion des hCIB mit Integrin$\alpha_{IIb}\beta_3$ festgestellt werden (Barry, W.T. *et al.*, 2002). Dabei konnten ebenfalls durch Mutationsanalysen für die Interaktion mit hCIB essentielle AS identifiziert werden, die am C-terminalen Ende der Transmembranregion des Integrin-Rezeptors liegen. Die Autoren nehmen basierend auf weiteren Untersuchungen an, dass diese Interaktion mit hCIB über hydrophobe AS vermittelt wird und die Assoziation zur Membran über die Myristoylierung erfolgt.

CIB besitzt keine bekannten Sequenzmotive, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln. Transformationsexperimente im Hefe-System mit Deletionskonstrukten von rCIB haben gezeigt, dass für die Interaktion mit rT1R2 das rCIB-Protein in seiner vollen Länge notwendig ist (vgl. 3.2.4). Die Eingrenzung eines Bereiches innerhalb des rCIB-Proteins wurde auch für die meisten anderen bekannten Interaktionspartner nicht beschrieben. Lediglich für die Interaktion mit Integrin$\alpha_{IIb}\beta_3$ konnte der C-terminale Bereich des hCIB-Proteins von AS 114-191 als Interaktionsbereich identifiziert werden (Tsuboi, S., 2002). Für eine Wechselwirkung mit CIB scheint somit in den meisten

Fällen die vollständige Sequenz zur Ausbildung der richtigen Konformation notwendig zu sein.

4.2.4 Subzelluläre Verteilung von CIB in Abhängigkeit der Myristoyl-Gruppe und Ca^{2+}

Für einige Mitglieder der EF-Hand-Superfamilie der Ca^{2+}-bindenden Proteine wird eine durch Ca^{2+}-Bindung erfolgte Konformationsveränderung beschrieben, durch die Interaktionen mit Zielproteinen reguliert werden können (Iacovelli, L. et al., 1999). Eine Gruppe solcher EF-Hand-Proteine sind die NCS (*neuronal calcium sensors*), die sehr heterogen bezüglich ihrer Gewebeverteilung sind. So kommen Recoverin und GCAPs (*guanylat cyclase activating proteins*) spezifisch in Photorezeptoren der Netzhaut vor, während Hippocalcin und Neurocalcin in zentralen Neuronen exprimiert werden. Frequenin (NCS-1) zeigt hingegen ein weit verbreitetes Expressionsmuster (O´Callaghan, D.W. *et al.*, 2002).

Diese NCS sind am N-Terminus myristoyliert und verfügen über vier charakteristische EF-Handmotive, wobei das EF-Handmotiv 1 durch den Austausch gezielter Aminosäuren nicht mehr in der Lage ist, Ca^{2+} zu binden (Burgoyne, R.D. & Weis, J.L., 2001). Die Besonderheit dabei ist, dass im Ca^{2+}-freien Status die Myristoylgruppe in einer hydrophoben Tasche verankert ist, die von der N-terminalen Region einschließlich des ersten EF-Handmotivs ausgebildet wird (Ames, J.B. *et al.*, 1997). Erst durch Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration und Bindung von Ca^{2+} erfahren diese Proteine eine Konformationsänderung, die zur Freilegung der Myristoylgruppe führt, die somit eine Assoziation zu Membranen vermitteln kann. Aufgrund dieses Mechanismus werden diese Proteine als *Calcium-Myristoyl-Switch*-Proteine bezeichnet.

Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der NCS Frequenin, Hippocalcin und Neurocalcin δ haben gezeigt, dass Hippocalcin und Neurocalcin δ ein diffuses Verteilungsmuster in HeLa-Zellen aufweisen. Ein durch Ionomycin-Behandlung erfolgter Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration bewirkt eine Umsortierung dieser Proteine, die daraufhin im perinukleären Raum an Membranen assoziiert vorliegen (O´Callaghan, D.W. *et al.*, 2002). Für Frequenin konnte keine Veränderung durch Ca^{2+} festgestellt werden, dieses Protein zeigt unabhängig von einer Ionomycin-Behandlung eine Lokalisation an Membranen im perinukleären Raum. In diesem Fall vermittelt die Myristat-Gruppe eine Assoziation an Membranen auch ohne Ca^{2+}.

Die Untersuchungen zur Expression von CIB haben gezeigt, dass die subzelluläre Verteilung des Proteins von dem Vorhandensein der Myristoylierung abhängig ist (vgl. 3.2.7). Stabler, S.M. *et al.* (1999) konnten die Myristoylierung des rekombinaten

humanen CIB-Proteins in HeLa-Zellen nachweisen, wobei N-terminal fusionierte Peptidsequenzen diese Modifikation verhindern.

Das mit einem N-terminalem FLAG-Peptid fusionierte rCIB-Protein zeigt in HEK293-Zellen überwiegend eine Lokalisation im Zellkern und Cytoplasma, wobei in einigen Zellen rCIB auch hauptsächlich im Kern vorkommt. Auch in anderen Zelllinien wie COS-7-, HeLa- und CHO-Zellen kann dieses Verteilungsmuster für N-terminal Epitop-markiertes CIB festgestellt werden (Kauselmann, G. *et al.*, 1999; Ma, S. *et al.*, 2003; Stabler, S.M. *et al.*, 1999; Haataja, L., *et al.*, 2002).

Für das endogene CIB-Protein (in diesem Fall als Calmyrin bezeichnet) in Primärkultur von Herzzellen sowie für das C-terminal Epitop-markierte CIB-Protein in HeLa-Zellen konnte eine Kern-, Cytoplasma- sowie zusätzlich eine Plasmamembran-Lokalisation beobachtet werden (Stabler, S.M. *et al.*, 1999). Dies stimmt mit der von mir beobachteten subzellulären Verteilung des Ratten CIB mit C-terminal fusioniertem FLAG-Peptid in HEK293-Zellen überein.

Für CIB wird eine Zugehörigkeit in die Gruppe der *Calcium-Myristyol-Switch*-Proteine postuliert (Barry, W.T. *et al.*, 2002). Neben dem Einfluss der Myristat-Gruppe auf die Verteilung des Proteins sind bisher allerdings keine Untersuchungen bekannt, ob das CIB-Protein seine Verteilung unter Ca^{2+}-Einfluss verändert.

Die Untersuchungen in HEK293-Zellen haben gezeigt, dass myristoyliertes rCIB, vermittelt über diese Fettsäure-Gruppe, eine Assoziation mit der Plasmamembran eingehen kann. Ein durch Ionomycin-Behandlung erhöhter Anstieg der Ca^{2+}-Konzentration verstärkt die Assoziation zur Membran. Für das nicht myristoylierte rCIB konnte kein Einfluss durch Calcium hinsichtlich der Lokalisation des Proteins in HEK293-Zellen beobachtet werden (vgl. 3.2.9). Das bedeutet, dass die Myristoyl-Gruppe nicht erst nach Ca^{2+}-Zugabe eine Assoziation an Membranen vermitteln kann, wie es für Hippocalcin und Neurocalcin δ der Fall ist. Allerdings könnte die verstärkte Assoziation auf eine durch Ca^{2+}-Bindung veränderte Konformation des CIB-Proteins zurückzuführen sein, wodurch eine bessere Zugänglichkeit der Myristoylgruppe zu Membranen erfolgen kann.

Eine Zugehörigkeit des CIB-Proteins in die Gruppe der *Calcium-Myristyol-Switch*-Proteine ist damit nicht eindeutig. Zudem weist die CIB-Sequenz nur einige der invariablen Charakteristika auf, die für den *Switch*-Mechanismus notwendig sind. CIB hat nur zwei C-terminal gelegene EF-Handmotive. Zudem fehlen essentielle AS, die das Umklappen des N-Terminus vermitteln, um die Myristoylgruppe im Ca^{2+}-freien Status in einer hydrophoben Tasche zu verankern.

CIB zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu den bekannten Ca^{2+}-bindenden Proteinen Calcineurin B (CnB) und Calmodulin (CaM), die an der Regulation der Aktivität vieler

Proteine beteiligt sind (Naik, U.P. *et al.*, 1997). Wie in dem Sequenzvergleich dargestellt (Abb. 32), zeigen diese Proteine noch weniger Merkmale eines *Switch*-Proteins. CIB könnte somit eine Art Brückenprotein sein, das zwischen den evolutionär konservierten Proteinen CaM und CnB und den NCS einzuordnen ist.

```
                                                EF1
   MGXXXS                          WY      CPXG              F  IY
1  MGNVMEGK----SVEEL------SSTECHQWYKKFMTEVPSGQLTLYE-------FRQFF mGCAP1
1  MGKSNS-KLKPEVVEELTRKTYFTEKEVQQWYKGFIKDCPSGQLDAAG-------FQKIY rFrequenin
1  MGKQNS-KLRPEMLQDLRBNTEFSELELQEWYKGFLKDCPTGILNVDE-------FKKIY rHippocalcin
1  MGNSKSGALSKEILEELQLNTKFTEEBLSAWYQSFLKECPSGRITRQE-------FESIY rRecoverin
1  MAD------------QLTE------EQIAEFKEAFSLF----DKDGDGTITTK---ELGT rCaM
1  MGNEAS--YPLEMCSHFDA------DEIKRLGKRFKKL----DLDNSGSLSVE---EF-M rCnB
1  MGGSGS-RLSKELLAEYQDLTFLTKQEILLAHRRFCELLPPEHRTVEESLHTRVSFEQIL rCIB

                                EF2                             EF3
     FF                          F      L      G       W
44 GLKNLSPSASQY-VEQMFETFDFNKDGYIDFMEYVAALSL-VLKGKVEQKLRWYFKLYDV mGCAP1
53 KQFFPFGDPTKF-ATFVFNVFDENKDGRIEFSEFIQALSV-TSRGTLDEKLRWAFKLYDL rFrequenin
53 ANFFPYGDASKF-AEHVFRTFDTNSDGTIDFREFIIALSV-TSRGRLEQKLMWAFSMYDL rHippocalcin
54 SKFFPDSDPKAY-AQHVPRSFDANSDGTLDFKEYVIALHM-TTAGKPTQKLEWAFSLYDV rRecoverin
36 VMRSLGQNPTEAELQDMINEVDADGNGTIDFPEFLTMMARKMKDTDSEEEIREAFRVFDK rCaM
45 SLPELQQNPL---VQRVIDIFDTDGNGEVDFKEFIEGVSQFSVKGDKEQKLRFAFRIYDM rCnB
60 SLPELKANPFKERICMVFST--SPTRDSLSFEDFLDLLSVFSDTATPDIKSHYAFRIFDF rCIB
```

Abb. 32: Sequenzvergleich der N-terminalen Regionen von NCS sowie CaM, CnB und CIB
Sequenzvergleich der NCS mGCAP1, rFrequenin, rHippocalcin, rRecoverin mit rCaM (Calmodulin), rCnB (Calcineurin B) und rCIB. Die Aminosäuren, die für die Zugehörigkeit der *Calcium-Myristoyl-Switch*-Proteine notwendig sind, sind in roter Schrift dargestellt und z.T. als Konsensussequnez über den Vergleich geschrieben. Der Bereich der in den NCS vorkommenden EF1 und EF2 sind als Linie über der Sequenz markiert.

4.2.5 Co-Lokalisationen im heterologen Zellsystem

Neben den Untersuchungen im Hefe-System sowie dem *Pulldown-Assay* und der Co-Immunopräzipitation, konnte durch Co-Lokalisationsstudien im heterologen Zellsystem ein weiterer Hinweis auf eine Interaktion von rT1R2 und rCIB *in vivo* erlangt werden. Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls nur der C-Terminus des rT1R2 eingesetzt.

Der Rezeptor rT1R2 allein sowie in Kombination mit dem rT1R3 in einer stabilen Zelllinie zeigt keine eindeutige Membranlokalisierung, sondern ein eher diffuses Verteilungsmuster. Es kann hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass der C-Terminus des rT1R2 aufgrund der fehlenden Membrantopologie und einer falschen Faltung nicht frei zugänglich ist.

Deshalb wurde der C-Terminus des rT1R2 C-terminal an EGFP fusioniert, in der Annahme, dass das fusionierte GFP eine Interaktion nicht verhindert.

Dieses Fusionsprotein EGFP-rT1R2ct zeigt neben einer sonst gleichmäßigen Verteilung in der Zelle eine auffällige Anreicherung in einem Kompartiment in der Nähe des Zellkerns. Durch eine immuncytochemische Anfärbung des Golgimarkers Golgin-97, konnte gezeigt werden, dass diese Aggregate im Bereich des Golgi liegen (vgl. 3.2.7). Da das Fusionsprotein EGFP-rT1R2ct Bereiche aus der siebten

Transmembranregion des rT1R2 enthält, kann diese Anreicherung des Proteins, vermutlich in Vesikel des TGN (*trans*-Golgi Netzwerk), auf eine fehlerhafte Sortierung zurückzuführen sein.
Bei einer transienten Co-Expression von EGFP-rT1R2ct und rCIB zeigen die Proteine ein übereinstimmendes Expressionsmuster in HEK293-Zellen. Zudem ist rCIB ebenfalls in denen mit EGFP-rT1R2ct angereicherten Vesikeln im Golgi lokalisiert, wobei diese Assoziation des rCIB-Proteins von dem Vorhandensein der Myristoylierung abhängig ist. Unmyristoyliertes rCIB scheint zentral in den Vesikeln zu liegen, während myristoyliertes rCIB in der Peripherie der Vesikel lokalisiert ist (vgl. 3.2.7). Weiterhin konnte in dem Fall der Co-Expression von rT1R2ct und dem C-terminal Epitop-markiertem rCIB-Protein keine Membranständigkeit für dieses mehr beobachtet werden.
Inwieweit rCIB hinsichtlich der Co-Lokalisation mit rT1R2ct im Golgi eine Funktion bei der Sortierung oder Zielsteuerung des Proteins übernimmt, ist nicht geklärt, zumal im Fall anderer Interaktionspartner für CIB eine solche Rolle bisher nicht beschrieben wurde.

Das rCIB-Protein verändert somit seine überwiegende Cytoplasma-, Kern- und Plasmamembranlokalisation bei einer Co-Expression mit rT1R2ct. Dieses Phänomen wird auch für andere bekannte Interaktionspartner beschrieben. So zeigt hCIB bei einer Co-Expression mit PS2 in HeLa-Zellen eine Lokalisation am ER, da PS2 am ER lokalisiert vorkommt. Bei einer Co-Expression mit der *Polo-Like* Kinase Snk wird hCIB ins Cytoplasma und bei einer Co-Expression mit Rac3 sowie mit NRB1 in den perinukleären Raum und in die Zellperipherie rekrutiert (Haataja, L. *et al.*, 2002; Whitehouse, C. *et al.*, 2002). Funktionen für diese Co-Lokalisationen sind allerdings bisher nicht bekannt.
Offensichtlich bestimmen die interagierenden Proteine die Lokalisation des rekombinant exprimierten CIB-Proteins, wie es auch für die Interaktion mit rT1R2 zutrifft. Das endogene Protein verhält sich vermutlich ähnlich. Dabei scheint die Myristoylierung des CIB-Proteins wichtig für seine Dynamik und Zielsteuerung zu den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten wie Cytoplasma, Plasmamembran und Nukleoplasma zu sein. Der Einfluss von Ca^{2+} ist dabei nicht geklärt.
Für rT1R2 und rCIB konnte bisher keine auffällige Veränderung hinsichtlich der subzellulären Verteilung beider Proteine durch eine Ionomycin-Behandlung beobachtet werden. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Co-Immunopräzipitationen überein.

4.2.6 Regulatorische Funktion des rCIB auf die Süß-Signaltransduktion

Die FLIPR-Experimente zur Untersuchung der Liganden vermittelten Rezeptoraktivierung in HEK293-Zellen haben gezeigt, dass der AS-Austausch Met_{818} zu Val am C-Terminus des rT1R2 einen wesentlichen Einfluss auf die Liganden-vermittelte Aktivierung des Rezeptors T1R2+3 ausübt. Da diese Mutation die Affinität zu rCIB maßgeblich reduziert, wird vermutlich aufgrund einer nicht mehr möglichen Wechselwirkung mit dem in HEK293-Zellen endogen exprimierten CIB-Proteins die Sensitivität des Rezeptors rT1R2+3 zu seinem Liganden Acesulfam K erhöht bzw. seine Desensitisierung vermindert.

Diese Beobachtung impliziert eine Funktion des CIB-Proteins im Bereich der Rezeptorregulierung des Süß-Rezeptors rT1R2+3.

Die Phosphorylierung von Rezeptoren nach Agonisten-Stimulation und damit seine homologe Desensitisierung erfolgt durch GRKs (*G-protein-coupled-recepor kinases*). Die Regulation der Aktivität sowie die Spezifität dieser Kinasen zu den Rezeptoren kann über CSP (*calcium sensor proteins*) vermittelt werden.

Für diesen regulatorischen Mechanismus sind einige Beispiele bekannt. So konnte *in vitro* der inhibitorische Einfluss von CaImodulin auf die Phosphorylierung von Rhodopsin durch GRK5 gezeigt werden (Pronin, A.N. *et al.*, 1997). Auch die Inhibierung von GRK1 zur Phosphorylierung von Rhodopsin konnte für mehere NCS, wie Recoverin, gezeigt werden (De Castro, E. *et al.*, 1995).

Aufgrund der Ähnlichkeiten von CIB zu CaM wie auch zu den NCS ist für CIB ebenfalls eine regulatorische Funktion auf eine bisher unbekannte GRK, die im chemosensorischen System die Phosphorylierung des rTR2+3 katalysiert, denkbar. Dabei könnte CIB durch die Interaktion mit T1R2 eine solche Kinase an den Rezeptor heranführen. CIB wäre somit eine Art Adapterprotein oder sogar eine regulatorische Untereinheit einer solchen Kinase. Im Fall einer nicht mehr stattfindenden Interaktion von CIB mit dem Rezeptor kann dieser nur noch mit einer geringeren Effizienz phosphoryliert werden (Abb. 33 A).

Man muss hierbei bedenken, dass das Medium zur Kultivierung der Zellen trotz minimaler Konzentration an Glucose und dialysiertem FCS immer noch potentielle Liganden für den T1R2+3 enthalten kann. Datenbank-Analysen weisen für rT1R2 an der dritten intrazellulären Schleife sowie am C-Terminus Phosphorylierungsstellen voraus. Eine partielle Phosphorylierung des Rezeptors zu Versuchsbeginn kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

CIB zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu CnB, der regulatorischen Untereinheit der Proteinphosphatase Calcineurin, auf. Es kann also auch spekuliert werden, ob CIB die regulatorische Untereinheit einer Phosphatase darstellt oder aber diese reguliert, und

damit an der Desensitisierung von GPCRs beteiligt ist. Für die im visuellen System von Drosophila identifizierte Rhodopsin Phosphatase, RDGC, konnte eine CaM vermittelte Regulation nachgewiesen werden (Lee, S.-J. & Montell, C., 2001).

Weiterhin könnte CIB zur Bindung an T1R2 in Konkurrenz mit einer Phosphatase stehen (Abb. 33 B). Ähnliches ist für die Ca^{2+}-abhängige Interaktion von Calmodulin mit mGluR5 und der Protein-Kinase C gezeigt (Minakami, R. *et al.*, 1997). Dabei konkurrieren CaM und PKC um die Bindung an den mGluR5. Wenn der Rezeptor durch PKC phosphoryliert ist, kann CaM nicht binden. Umgekehrt wird dieser nicht phosphoryliert, wenn CaM bindet.

Wenn CIB mit einer Phosphatase um die Bindung an T1R2 konkurriert, könnte im Fall der nicht mehr stattfindenden Interaktion mit CIB aufgrund der Mutation im T1R2 eine effizientere Phosphorylierung des Rezeptors erfolgen. Somit hätte der Rezeptor eine höhere Affinität zu seinem Liganden und die Kopplung des G-Proteins wäre erhöht.

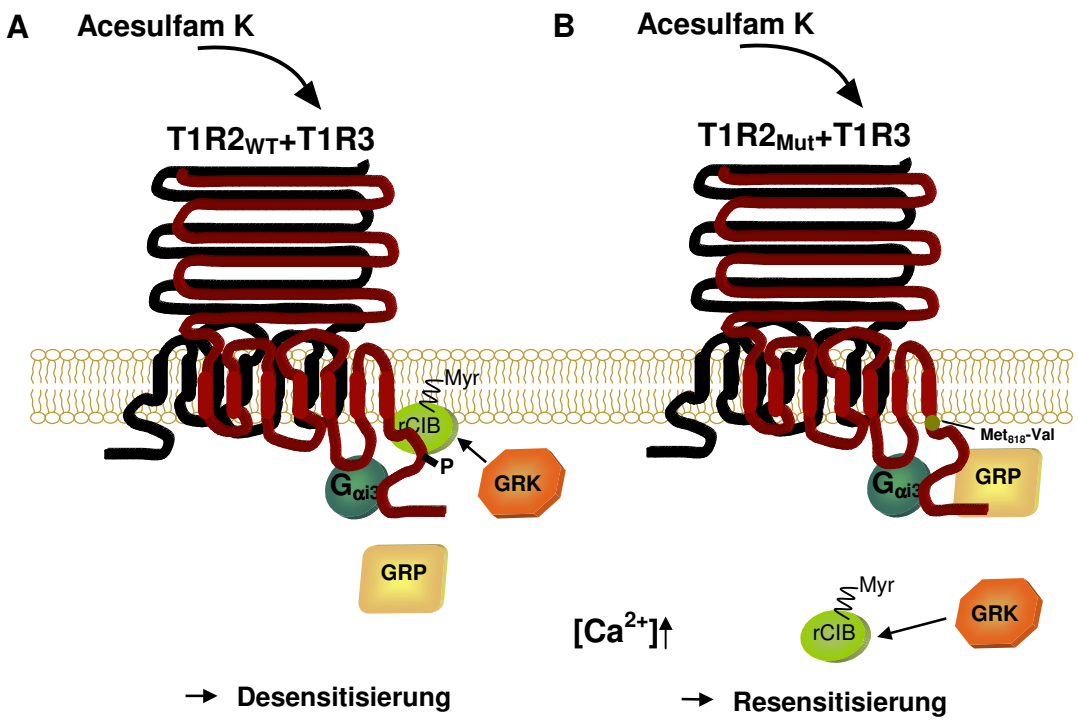


Abb. 33: Einfluss von rCIB auf die Desensitisierung/ Resensitisierung des Rezeptors
A:. CIB kann durch Liganden-vermittelte Konformationsänderung des Rezeptors oder durch Anstieg von Ca^{2+} als Signal eine bisher nicht bekannte GRK (*G protein-coupled receptor kinase*) aktivieren, diese an den Rezeptor heranführen, und somit die Phosphorylierung des Rezeptors fördern. Eine GRP (*G protein-coupled receptor phosphatase)* kann nicht binden, da diese mit CIB um Bindung konkurriert.
B: Durch die Mutation des rT1R2 am C-Terminus kann CIB nicht mehr binden. Die Phosphorylierung des Rezeptors ist somit nicht effektiv. Eine GRP kann auch phosphorylierte Rezeptoren effizienter dephosphorylieren, da sie nicht mehr mit CIB konkurrieren muss.

Diese Untersuchungen geben einen ersten Hinweis darauf, dass CIB an der Regulation der Rezeptoraktivität beteiligt sein kann. Dabei liegt hier eine Spezifität für

den Süß-Rezeptor T1R2+3, nicht aber den Umami-Rezeptor T1R1+3 vor, da CIB weder mit T1R1 noch mit T1R3 interagiert.

Um diesen beobachteten Effekt sicher auf eine nicht mehr vorhandene Interaktion mit dem CIB zurückführen zu können, sind weitere Kontrollexperimente notwendig. So sollte durch die Reprimierung des endogenen CIB durch siRNA für den Wildtyp Rezeptor $T1R2_{WT}$+3 eine vergleichbar hohe Sensitivität gegenüber dem Liganden Acesulfam K zu erwarten sein wie für den mutierten $T1R2_{Mut}$+3 (vgl. 3.2.11).

Weiterhin ist zu untersuchen, ob dieser Effekt von CIB nur für künstliche Süßstoffe wie Acesulfam K oder generell auch für Zucker zutrifft. Somit könnten weitere Hinweise erlangt werden, ob die Rezeptoraktivität sowie der Signaltransduktionsweg durch unterschiedliche Liganden bestimmt wird.

5. Zusammenfassung

An der primären Rezeption des Umami- und Süß-Geschmacks sind die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) T1R1, T1R2 und T1R3 beteiligt, die der T1R-Familie zugeordnet werden. Diese bilden Heterodimere in den Kombinationen T1R1 mit T1R3 sowie T1R2 mit T1R3 aus, wobei T1R1+3 den Umami-Rezeptor und T1R2+3 den Süß-Rezeptor darstellt.
Da in einigen Geschmackssinneszellen T1R3 weder mit T1R1 noch mit T1R2 co-exprimiert wird, kann die Existenz eines weiteren bisher nicht identifizierten Rezeptors, der in diesen Zellen mit dem T1R3 einen Heterodimer ausbildet, postuliert werden.
In dieser Arbeit konnte ein neuer den T1R-Mitgliedern ähnlicher GPCRs, der rTRX, kloniert werden, wobei die Amplifizierung durch PCR-Strategien aus mRNA der circumvallaten Papille erfolgte.
Sequenzanalysen zeigen für rTRX die höchsten Identitäten zu den Rezeptoren aus der T1R-Familie sowie zu dem für L-Arginin responsiven Geruchs-Rezeptor OR5.24 aus dem Goldfisch und zu dem CaSR (Calcium *Sensing*-Rezeptor).
RT-PCR-Analysen zur Untersuchung der Expression des rTRX im Geschmacksgewebe der Ratte haben gezeigt, dass dieser präferentiell im Geschmacksstreifen vorkommt.
Ein weiterer Ansatz zur Einordnung des Rezeptors in die T1R-Familie erfolgte durch Untersuchungen zur Dimerisierung des rTRX bzw. T1R2 mit T1R3. Dabei konnte für die in ihrer vollen Länge rekombinant exprimierten Rezeptoren in HEK293-Zellen durch Co-Immunopräzipiationen eine Interaktion für rTRX mit T1R3 sowie für T1R2 mit T1R3 nachgewiesen werden.

Neben den Protein-Protein-Wechselwirkungen der Rezeptoren untereinander befasst sich diese Arbeit mit der Untersuchung von intrazellulären Proteinen, die durch eine Interaktion mit der C-terminalen Domäne der Rezeptoren an der Signaltransduktion innerhalb der T1R-Familie beteiligt sind. Dabei wurde ein aus dem Hefe Zwei-Hybrid-System identifizierter Interaktionspartner für den C-Terminus des T1R2 der Ratte, das Calcium- und Integrin-bindende Protein (CIB), charakterisiert.
CIB ist ein kleines Protein, das am N-Terminus über eine Konsensussequenz [MGXXXS] zur Myristoylierung verfügt und über seine zwei EF-Handmotive Ca^{2+} binden kann.
Untersuchungen zur subzellulären Verteilung des rekombianten CIB-Proteins haben gezeigt, dass diese von Ca^{2+} und der Myristoylierung abhängig ist.

Es konnten hierbei Ähnlichkeiten von CIB zu einer Klasse von CSP (*calcium sensor protein*) festgestellt werden, die ebenfalls der Superfamilie der Calcium-bindenden Proteine zugeordnet werden.

Durch Northern Blot- und RT-PCR-Analysen konnte für die CIB-mRNA aus der Ratte eine ubiquitäre Verteilung festgestellt werden, die sich auch für das Geschmacksepithel bestätigte. Eine *in vivo* Interaktion des rT1R2 mit rCIB in den Geschmackspapillen der Ratte ist somit möglich.

Transformationsexperimente im Hefe Zwei-Hybrid-System haben gezeigt, dass CIB spezifisch mit T1R2 eine Wechselwirkung eingeht, nicht aber mit den anderen Mitgliedern der T1R-Familie. Zudem konnte durch Deletionskonstrukte für das CIB-Protein gezeigt werden, dass für die Interaktion von T1R2 CIB in seiner vollen Länge zur Ausbildung der richtigen Tertiärstruktur notwendig ist.

Ausserhalb des Hefesystems wurde die Interaktion des CIB mit T1R2 biochemisch durch Co-Immunopräzipitation sowie durch einen GST-*Pulldown-Assay* verifiziert. Auch durch Co-Lokalisationsstudien in HEK293-Zellen konnte bei einer Co-Expression ein Einfluss von T1R2 auf die subzelluläre Verteilung des CIB festgestellt werden.

Mutationsanalysen führten zu der Identifizierung einer Aminosäure innerhalb des rT1R2, Met_{818}, die essentiell für eine Interaktion mit CIB ist.

Eine funktionelle Expression des Rezeptorpaares T1R2+3 in HEK293-Zellen zeigte, dass ein Austausch der für die CIB-Bindung verantwortlichen Aminosäure Met_{818} gegen Val einen deutlichen Einfluss auf die Rezeptoraktivität hat. Der mutierte Rezeptor wird bei einer um den Faktor 2 geringeren Konzentration des Süß-Liganden Acesulfam K zu 50% aktiviert. Die veränderte Dosis-Wirkungs-Kurve impliziert einen Einfluss von CIB auf die Sensitisierung/ Desensitisierung der Rezeptoraktivität.

6. Literaturverzeichnis

Abe, K., Kusakabe, Y., Tanemura, K., Emori, Y. & Arai, S. (1993) Primary structure and cell-type specific expression of a gustatory G protein-coupled receptor related to olfactory receptors. J. Biol. Chem. **268**, 12033-12039

Adler, E., Hoon, M.A., Mueller, K.L., Chandrashekar, J., Ryba, N.J.P. & Zucker, C.S. (2000). A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. Cell **100**, 693-702

Ames, J.B., Ishima, R., Tanaka, T., Gordon, J.I., Stryer, L. & Ikura, M. (1997) Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches. Nature **389**, 198-202

Angers, S., Salahpour, A. & Bouvier, M. (2002) Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **42**, 409-435

Barry, W.T., Boudignon-Proudhon, C., Shock, D.D., McFadden, A., Weiss, J.M., Sondek, J. & Parise, L.V. (2002) Molecular Basis of CIB Binding to the Integrinα_{IIb} Cytoplasmic Domain. J. Biol. Chem. **277**, 28877-28883

Beauchamp, G.K. & Bachmanov, A.A. (2001) High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (*Sac*) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (*Gpr70*) to mouse distal Chromosome 4. Mammalian Genome **12**, 13-16

Bernhardt, S.J., Naim, M., Zehavi, U. & Lindemann B. (1996) Changes in IP_3 and cytosolic Ca^{2+} in response to sugars and non-sugar sweeteners in transduction of sweet taste in the rat. J. Physiol. **490**, 325-336

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 Sci. **9**, 2200-2209

Boudin, H., Doan, A., Xia, J., Shigemoto, R., Huganir, R.L., Worley, P. & Craig, A.M. (2000) Presynaptic clustering of mGluR7a requires the PICK1 PDZ domain binding site. Neuron **28**,485-497

Brady, A.E. & Limbird, L.E. (2001) G protein-coupled receptor interacting proteins: Emerging roles in localization and signal transduction. Cellular Signalling **14**, 297-309

Brunet, L.J., Gold, G.H. & Ngai, J. (1996) General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. Neuron **17**, 681-693

Bufe, B., Hofmann, T., Krautwurst, D., Raguse, J.-D. & Meyerhof, W. (2002) The human TASR16 receptor mediates bitter taste in response to β-glucopyranosides. Nat. genet. **32**, 397-401

Burgoyne, R.D. & Weiss, J.L. (2001) The neuronal calcium sensor family of Ca^{2+}-binding proteins. Biochem. J. **353**, 1-12

Caicedo, A., Kim, K.N. & Roper, S.D. (2002) Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. J. Physiol. **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., Zucker, C.S. & Ryba, N.J.P. (2000). T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. Cell **100**, 703-711

Chen, C.K., Inglese, J., Lefkowitz, R.J. & Hurley, J.B. (1995) Ca^{2+}-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. J. Biol. Chem. **270**, 18060-18066

Chevesich, J., Kreuz, A.J. & Montell, C. (1997) Requirement for the PDZ domain protein, INAD, for localization of the TRP store-operated channel to a signaling complex. Neuron **18**, 95-105

Chuang, T.T., Iacovelli, L., Sallese, M. & De Blasi, A. (1996) G protein-coupled receptors: heterologous regulation of homologous desensitization and is implications. Trends Pharmacol. Sci. **17**, 416-421

Chuang, T.T., Paolucci, L. & De Blasi, A. (1996) Inhibition of G Protein-coupled Receptor Kinase Subtypes by Ca^{2+}/Calmodulin. J. Biol. Chem. **271**, 28691-28696

Couve, A., Filippov, A.K., Connolly, C.N., Bettler, B., Brown, D.A. & Moss, S.J. (1998) Intracellular Retention of Recombinant $GABA_B$ Receptors. J. Biol. Chem. **273**, 26361-26367

De Castro, E., Nef, S., Fiumelli, H., Lenz, S.E., Kawamura, S. & Nef, P.(1995) Regulation of rhodopsin phosphorylation by a family of neuronal calcium sensors. Biochem. Biophys. Res. Commun. **216**, 133-140

Dev, K.K., Nishimune, A., Henley, J.M. & Nakanishi, S. (1999) The protein kinase C alpha binding protein PICK1 interacts with short but not long form alternative splice variants of AMPA receptor subunits. Neuropharmacology **38**, 635-644

Dev, K.K., Nakanishi, S. & Henley, J.M. (2001) Regulation of mglu7 receptors by proteins that interact with the intracellular C-terminus. TRENDS Pharmacol. Sci. **22**, 355-361

Dwyer, N.D., Troemel, E.R., Sengupta, P. & Bargmann, C.I. (1998) Odorant receptor localization to olfactory cilia is mediated by ODR-4, a novel membrane-associated protein. Cell **93**, 455-66

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 Ca^{2+} receptor: effects on cell surface expression, dimerization and signal transduction. FEBS Lett. **43**6, 353-356

Freedmann, N.J. & Lefkovitz, R.J. (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. Recent Prog. Horm. Res. **51**, 319-353

Fuller, J.L. (1974) Single-Locus control of saccharin preference in mice. J. Hered. **65**, 33-36

Gilbertson, T.A., Boughter, J.D. Jr., Zhang, H. & Smith, D.V. (2001) Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: whole-cell responses to apical chemical stimulation. J. Neurosci. **21**, 4931-4941

Gilbertson, T.A., Roper, S.D. & Kinnamon, S.C. (1993) Proton currents through amiloride-sensitive Na^+ channels in isolated hamster taste cells: enhancement by vasopressin and cAMP. Neuron **10**, 931-942

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 Pharmacol. **61**, 1070-1080

Haataja, L., Kaartinen, V., Groffen, J. & Heisterkamp, N. (2002) The Small GTPasa Rac3 Interacts with the Integrin-binding Protein CIB and Promotes Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$-mediated Adhesion and Spreading. J. Biol. Chem. **277**, 8321-8328

Haeseleer, F., Imanishi, Y., Sokal, I., Filipek, S. & Palczewski, K. (2002) Calcium-binding proteins: intracellular sensors from the calmodulin superfamily. Biochem. Biophys. Res. **290**, 615-623

Haga, K., Tsuga, H. & Haga, T. (1997) Ca^{2+}-dependent inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 by calmodulin. Biochemistry **36**(6),1315-21

Hall, R.A. & Lefkovitz R.J. (2002) Regulation of G Protein-Coupled Receptor Signalling by Scaffold Proteins. Circulation Research **91**, 672-680

Heck, G.L., Mierson, S. & DeSimone, J.A. (1984) Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. Science **223**, 403-405

Hermans, E. & Challis, J. (2001) Structural, signaling and regulatory properties of the groupI metabotropic glutamate receptors: prototypic familiy C G-protein-coupled receptors. Biochem. J. **359**, 465-484

Herness, M.S. & Gilbertson, T.A. (1999) Cellular mechanisms of taste transduction. Ann. Rev. Physiol. **61**, 873-900

Hoon, M.A., Adler, E. Lindemeier, J., Battey, J.F., Ryba, N.J.P. & Zuker, C.S (1999) Putative Mammalian Taste Receptors: A Class of Taste-Specific GPCRs with distinct Topographic Selectivity. Cell **96**, 541-551

Huber, A. (2001) Scaffolding proteins organize multimolekular protein complexes for sensory signal transduction. European Journal of Neuroscience **14**, 769-776

Huber, A., Sander, P., Gobert, A., Bahner, M., Hermann, R. & Paulsen R. (1996) The transient receptor potential protein (Trp), a putative store-operated Ca^{2+} channel essential for phosphoinositide-mediated photoreception, forms a signalling complex with NorpA, InaC and InaD. EMBO J. **15**, 7036-7045

Iacovelli, L., Sallese, M., Mariggio, S. & De Blasi, A. (1999) Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. FASEB J. **13**, 1-8

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**, 674-9

Kammerer, R.A., Frank, S., Schulthess, T., Landwehr, R., Lustig, A. & Engel, J. (1999) Heterodimerization of a Funktional $GABA_B$ Receptor Is mediated by Parallel Coiled-Coil α-Helices. Biochemistry **38**, 13263-13269

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**, 683-7

Kauselmann, G., Weiler, M., Wulf, P., Jessberger, S., Konietzko, U., Scafidi, J., Staubli, U., Bereiter-Hahn, J., Strebhardt, K. & Kuhl, D. (1999) The polo-like protein kinases Fnk and Snk assoziate with a Ca^{2+}- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. EMBO J. **18**, 5528-5539

Kim, S.K. (1997) Polarized signaling: basolateral receptor localization in epithelial cells by PDZ-containing proteins. Curr. Opin. Cell Biol. **9**, 853-859

Kinnamon, S.C., Dionne, V.E. & Beam, K.G. (1988) Apical localization of K channels in taste cells provides the the basis of sour taste transduction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **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. Biochem. and Biophys. Res. Comm. **283**, 236-242

Klenchin, V.A., Calvert, P.D. & Bownds, M.D. (1995) Inhibition of rhodopsin kinase by recoverin. J. Biol. Chem. **270**, 16147-16152

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B. & Seeburg, P.H. (1995) Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. Science **269**, 1737-1740

Korschen, H.G., Beyermann, M., Muller, F., Heck, M., Vantler, M., Koch, K.W., Kellner, R., Wolfrum, U., Bode, C., Hofmann, K.P. & Kaupp, U.B. (1999) Interaction of glutamic-acid-rich proteins with the cGMP signalling pathway in rod photoreceptors. Nature **400**, 761-766

Krautwurst, D., Yau, K.W. & Reed, R.R. (1998) Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. Cell **95**, 917-26

Kreienkamp, H.-J., Soltau, M., Richter, D. & Böckers, T. (2002) Interaction of G-protein-coupled receptors with synaptic scaffolding proteins. Biochem. Society Transactions **30**, 464-468

Krupnick, J.G. & Benovic, J.L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G-protein-coupled receptor regulation. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **38,** 289-319

Kuner, R., Köhr, G., Grünewald, S., Eisenhardt, G., Back, A. & Kornau, H.-C. (1999) Role of Heteromer Formation in $GABA_B$ Receptor Funktion. 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,** 971-7

Laemmli, U.K. (1970) Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685

Lee, S.J. & Montell, C. (2001) Regulation of the rhodopsin protein phosphatase, RDGC, through interaction with calmodulin. Neuron **32**(6),1097-1106

Lewcock, J.W. & Reed, R.R. (2001) Sweet successes. Neuron 31, 515-7

Leypold, B.G., Yu, C.R., Leinders-Zufall, T., Kim, M.M., Zufall, F. & Axel, R. (2002) Altered sexual and social behaviors in trp2 mutant mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **99**, 6376-6381

Li, X., Inoue, M., Reed, D.R., Huque, T, Puchalski, R.B., Tordoff. M.G., Ninomiya, Y., Beauchamp, G.K. & Bachmanov, A.A. (2001) High-resolution genetic mapping of the saccharin preference locus (*Sac*) and the putative sweet taste receptor (T1R1) gene (*Gpr70*) to mouse distal Chromosome 4. Mammalian Genome **12**, 13-16

Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M. & Adler, E. (2002) Human Receptors for sweet and umami taste. PNAS **99**, 4692-4696

Lindemann, B. (1996), Taste Reception. Physiological Reviews **76**, 719-757

Lindemann, B. (2001), Receptors and transduction in taste. Nature **413**,219-225

Lush, I.E. (1989) The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin, acesulfame, dulcin and sucrose. Genet Res **53**, 95-9

Ma, S., Liu, M.-A., Yuan, Y.-L. O. & Erikson, R.L. (2003) The Serum-Inducible Protein Kinase Snk Is a G1 Phase Polo-Like Kinase That Is Inhibited by the Calcium- and Integrin-Binding Protein CIB. Mol. Cancer. Res. **1**, 376-384

Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N. & Jan, L.Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. Neuron 27, 97-106

Margolskee, R.F. (2002) Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. J. Biol. Chem. **277**, 1-4

Matsunami, H., Montmayeur, J.-P. & Buck, L. B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. Nature **404**, 601-603

Max, M., Shanker, Y.G., Huang, L., Rong, M., Liu, Z., Campagne, F., Weinstein, H., Damak, S. & Margolskee, R.F. (2001) *Tasr3*, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus *Sac.* Nature genetics **28**, 58-63

Minakami, R., Jinnai, N. & Sugiyama, H. (1997) Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic *in vitro*. J Biol Chem **272**, 20291-8

Minke, B., Cook, B. (2002) TRP channel proteins and signal transduction. Physiol Rev **82**, 429-72

Misaka, T., Kusakabe, Y., Emori, Y., Gonoi, T., Arai, S. & Abe, K. (1997) Taste Buds Have a Cyclic Nucleotide-activated Channel, CNGgust. J. Biol. Chem. **272**, 22623-22629

Miyamoto, T., Fujiyama, R., Okada, Y. & Sato, T. (1998) Sour transduction involves activation of NPPB-sensitive conductance in mouse taste cells. J. Neurophysiol. **80**, 1852-1859

Miyamoto, T., Fujiyama, R., Okada, Y. & Sato, T. (2000) Acid and salt responses in mouse taste cells. Prog. Neurobiol. **62**, 135-157

Montell, C. (2000) A PDZ protein ushers in new links. Nat Genet. **26**, 6-7

Montini, E., Rugarli, E.I., Van de Vosse, E., Andolfi, G., Mariani, M., Puca, A.A., Consalez, G.G., den Dunnen, J.T., Ballabio, A. & Franco, B. (1997) A novel human serine-threonin phosphatase related to the *Drosophila retinal degeneration* C (*rdg*C) gene is selectively expressed in sensory neurons of neural crest origin. Hum. Mol. Gen. **6**, 1137-1145

Montmayeur, J.P., Liberles, S.D., Matsunami, H. & Buck, L. (2001) A candidate taste teceptor gene near a sweet taste locus. Nature neuroscience **4**, 492-498

Naik, U.P., Patel, P.M. & Parise, L.V. (1997) Identification of a Novel Calcium-binding Protein That interacts with the Integrin α_{IIb} cytoplasmic Domain. J. Biol. Chem. **272**, 4651-4654

Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M.A., Feng, L., Zhao, G., Ryba, N.J.P. & Zucker, C.S. (2002). An amino-acid taste receptor. Nature **416**, 199-202

Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N.J.P. & Zucker, C.S. (2000). Mammalian Sweet Taste Receptors. Cell **106**, 381-390

O´Callagan, D.W., Ivings, L., Weiss, J.L. Ashby, M.C. Tepikin, A.V. & Burgoyne, R.D. (2002) Differential Use of Myristoyl Groups on Neuronal Calcium Sensor Proteins as a Determinant of Spation-temporal Aspects of Ca^{2+}. J. Biol. Chem. **277**, 14227-14237

O´Connor, V., El Far, O., Bofill-Cardona, E., Nanoff, C., Freissmuth, M., Karschin, A., Airas, J.M., Betz, H. & Boehm, S. (1999), Calmodulin dependence of presynaptic metabotropic glutamate receptor signaling. Science **286**, 1180-1184

Olah, G.A., Trakhanov, S., Trwhella, J. & Quichoto, T.A (1993) Leucin/ isoleucin/ valine-binding protein contacts upon binding of ligand. J. Biol. Chem. **268**, 16241-16247

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. J. Biol. Chem. **274**, 11629-11634

Palczewski, K. (1997) GTP-binding-protein-coupled receptor kinases. Eur. J. Biochem., **148**, 261-269

Parmentier, M.L., Prezeau, L., Bockaert, J. & Pin, J.P. (2002) A model for the functioning of family 3 GPCRs. Trends Pharmacol. Sci. **23**, 268-274

Perez, C.A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J.A., Preuss, A.K., Zhang, H., Max, M. & Margolskee, R.F. (2002) A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. Nat. Neurosci. **5**, 1169-1176

Pitcher, J.A., Payne, E.S., Csortos, C., DePaoli-Roach, A.A. & Lefkowitz, R.J. (1995) The G-protein-coupled receptor phosphatase: A protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity. Biochemistry **92**, 8343-8347

Pronin, A.N., Satpaev, D.K., Slepak, V.Z. & Benovic, J.L. (1997) Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. J. Biol. Chem. 272, 18273-18280

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. J. Biol. Chem. **274**, 27642-27650

Reed, D.R., Bartoshuk, L.M., Duffy, V., Marino, S., Price, R.A. (1995) Propylthiouracil tasting: determination of underlying threshold distributions using maximum likelihood. Chem. Senses **20**, 529-33

Robbins, M.J., Ciruela, F., Rhodes, A. & McIlhinney, R.A.J. (1999) Characterization of the dimerization of metabotropic glutamate receptors using an N-terminal truncation of mGluR1alpha. Neurochem. **72**, 2539-2547

Romano, C., Yang, W.L. & O'Malley, K.L. (1996) Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer. J. Biol. Chem. **271**, 28612-28616

Rosemond, E., Peltekova, V., Naples, M., Thøgersen, H. & Hampson, D.R. (2002) Molecular Determinants of High Affinity Binding to Group III Metabotropic Glutamate Receptors. J. Biol. Chem. **277**, 7333-7340

Rossler, P., Kroner, C., Freitag, J., Noe, J. & Breer, H. (1998) Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells. Eur. J. Cell Biol. **77**, 253-261

Ruiz-Avila, L., Wong, G.T., Damak, S. & Margolskee, R.F. (2001) Dominant loss of esponsiveness to sweet and bitter compounds caused by a single mutation in alpha-gustducin. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **98**, 8868-8873

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, T., Seki, N., Hattori, A., Hayashi, A., Abe, M., Araki, R., Fujimori, A., Fukumura, R., Kozuma, S. & Matsuda, Y. (1999) Structure, expression profile, and chromosomal location of a mouse gene homologous to human DNA-PKcs interacting protein (KIP) gene. Mamm. Genome **10**, 315-317

Sallese, M., Iacovelli, L., Cumashi, A., Capobianco, L., Cuomo, L. & De Blasi, A. (2000) Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. Biochim. Biophys. Acta. **1498**, 112-21

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463-5467

Schnewly, S., Shortridge, R.D., Larrivee, D.C., Ono, T., Ozaki, M. & Pak, W.L. (1989) Drosophila ninaA gene encodes an eye-specific cyclophilin (cyclosporine A binding protein). Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 5390-5394

Scott, K. & Zucker, C.S. (1998) Assembly of the Drosophila phototransduction cacscade into a signalling complex shapes elementary responses. Nature **395**, 805-808

Shock, D.D., Naik, U.P., Brittain, J.E., Alahari, S.K., Sondek, J. & Parise, L.V. (1999) Calcium-dependent properties of CIB binding to the integrin αIIb cytoplasmic domain and translocation to the platelet cytoskeleton. Biochem. J. **342**, 729-735

Speca, D.J., Lin, D.M., Sorensen, P.W., Isacoff, E.Y., Ngai, J. & Dittman, A.H. (1999) Functional Identification of a Goldfish Odorant Receptor. Neuron **23**, 487-498

Stabler, S.M., Ostrowski, L.L., Janicki, S.M. & Monteiro, M.J. (1999) A myristoylated calcium-binding protein that preferentially interacts with the Alzheimer's disease presenilin 2 protein. J Cell Biol **145**, 1277-1292

Staudinger, J., Lu, J., Olson, E.N. (1997) Specific interaction of the PDZ domain protein PICK1 with the COOH terminus of protein kinase C-alpha. J Biol Chem **272**, 32019-24

Steele, F.R., Washburn, T., Rieger, R., O'Tousa, J.E. (1992) Drosophila retinal degeneration C (rdgC) encodes a novel serine/threonine protein phosphatase. Cell **69**, 669-76

Stevens, D.R., Seifert, R., Bufe, B., Muller, 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

Stowell, J.N., Craig, A.M. (1999) Axon/dendrite targeting of metabotropic glutamate receptors by their cytoplasmic carboxy-terminal domains. Neuron **22**, 411-2

Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C. & Koentges, G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. Science **295**, 1493-1500

Torres, R., Firestein, B.L., Dong, H., Staudinger, J., Olson, E.N., Huganir, R.L., Bredt, D.S., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D. (1998) PDZ proteins bind, cluster, and synaptically colocalize with Eph receptors and their ephrin ligands. Neuron**21**, 1453-63

Tsuboi, S. (2002) Calcium Integrin-binding Protein Activates Platelet Intgrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. J. Biol. Chem. **277**, 1919-1923

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. J. Biol. Chem. **275**, 28144-28151

Tsunoda, S., Sierralta, J., Sun, Y., Bodner, R., Suzuki, E., Becker, A., Socolich, M. & Zuker, C.S. (1997) A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. Nature **388**, 243-249

Ugawa, S. *et al.* (1998) Receptor that leaves a sour taste in the mouth. Nature **395**, 555-556

Vinos, J., Jalink, K., Hardy, R.W., Britt, S.G. & Zuker, C.S. (1997) A G Protein-Coupled Receptor Phosphatase Required for Rhodopsin Function. Science **277**, 687-690

Warren, R.P., Lewis, R.C. (1970) Taste polymorphism in mice involving a bitter sugar derivative. Nature **227**, 77-8

Wes, P.D., Xu, X.Z., Li, H.S., Chien, F., Doberstein, S.K. & Montell, C. (1999) Termination of phototransduction requires binding of the NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. Nat. Neurosci. **2**, 447-453

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

Whitehouse, C., Chambers, J., Howe, K., Cobourne, M., Shape, P. & Solomon, E. (2002) NBR1 interacts with fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) and calcium and integrin binding protein (CIB) and shows developmentally restricted expression in the neural tube. Eur. J. Biochem. **269**, 538-545

Wong, G.T., Gannon, K.S. & Margolskee, R.F. (1996) Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. Nature **381**, 796-800

Xu, X.Z., Choudhury, A., Li, X. & Montell, C. (1998) Coordination of an array of signaling proteins through homo- and heteromeric interactions between PDZ domains and target proteins. J. Cell Biol. **142**, 545-55

Yan, W., Sunavala, G., Rosenzweig, S., Dasso, M., Brand, J.G. & Spielman, A.I. (2001) Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides. Am. J. Physiol. Cell Physiol. **280**, 742-751

Zeng, F.Y. & Wess, J. (1999) Identification and molecular characterization of m3 muscarinic receptor dimers. J. Biol. Chem. **274**, 19487-19497

Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., Zucker, C. S. & Ryba, N. J. P. (2003). Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes: Different Receptor Cells Sharing Similar Signaling Pathways. Cell **112**, 293-301

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hartwig Schmale danke ich für die Überlassung des Themas und für das Interesse und das Engagement, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
Für die Begutachtung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. H. Schmale und Herrn Prof. H. Bretting.
Marcel Winnig und Bernd Bufe danke ich für die Ermöglichung und die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der FLIPR-Experimente in Potsdam und für die stabilen Flp-In-Zelllinien rT1R2+3 und rT1R3. Das gemeinschaftliche Interesse am „Geschmack“ war dabei sehr motivierend.
Herrn Dr. Ralf Middendorf danke ich für die Ermöglichung der Durchführung der immunhistochemischen Experimente und die Bereitstellung der Gewebeschnitte.
Allen aus dem Institut möchte ich für die Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre im Laboralltag danken.
Außerhalb der Wissenschaft möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir während meiner gesamten Ausbildung den nötigen Rückhalt gegeben haben. Für seine positive Lebenseinstellung und große Geduld danke ich meinem Freund Daniel.

Lebenslauf

Name	Nicole Burhenne
Geburtsdatum	13.11.1973
Geburtsort	Witzenhausen
Familienstand	ledig

Ausbildung

1993	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife an der Gymnasialen Oberstufe der Rhenanus-Schule Bad Sooden-Allendorf
10/1993-02/1998	Studium der Biologie an der Universität Göttingen
03/1998-06/1999	Diplomarbeit am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften
07/1999-11/1999	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Georg-Augst-Universität Göttingen
seit 01/2000	Promotion am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie der Universität Hamburg