

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 Geschmackstreifen 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-Immunopräzipitationen 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, Met₈₁₈, die essentiell für eine Interaktion mit CIB ist.

Eine funktionelle Expression des Rezeptorpaars T1R2+3 in HEK293-Zellen zeigte, dass ein Austausch der für die CIB-Bindung verantwortlichen Aminosäure Met₈₁₈ 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.