

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie  
der Universität Würzburg  
Lehrstuhl für Anatomie II  
Vorstand: Prof. Dr. med. Detlev Drenckhahn

Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern  
gegen die Geschmacksrezeptoren  
T1R1 und T1R2

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Andreas Löser  
aus Bad Neustadt a. d. Saale

Würzburg, November 2002

Referent: Professor Dr. med. Detlev Drenckhahn  
Koreferent: Professor Dr. med. Peter Kugler  
Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2003

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

in

Liebe und Dankbarkeit

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Anatomische Grundlagen der Geschmackswahrnehmung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die fünf Geschmacksqualitäten</b> .....	<b>4</b>
1.2.1	Ionenkanal-vermittelte Geschmackswahrnehmung .....	6
1.2.2	Rezeptor-vermittelte Geschmackswahrnehmung .....	6
<b>1.3</b>	<b>Die T1R-Geschmacksrezeptorfamilie</b> .....	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Allgemeine Lösungen und Materialien</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2</b>	<b>Lebendmaterialien</b> .....	<b>13</b>
<b>2.3</b>	<b>Nukleinsäuren</b> .....	<b>14</b>
2.3.1	Plasmide.....	14
2.3.2	Nukleinsäure-Größenmarker .....	14
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.4.1	DNA-Gewinnung.....	15
2.4.1.1	Plasmid-Minipräp .....	15
2.4.1.2	Plasmid-Minipräparation nach Qiagen .....	16
2.4.1.3	Plasmid-Großpräparation nach Qiagen.....	16
2.4.1.4	DNA-Fragmentisolierung aus Agarosegelen nach Genomed .....	17
2.4.2	Reinigung von DNA .....	18
2.4.2.1	7,5 M Ammoniumacetatfällung.....	18
2.4.2.2	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI).....	18
2.4.3	Analyse von Nukleinsäuren .....	19
2.4.3.1	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	19
2.4.3.2	Agaroseelektrophorese von DNA.....	19
2.4.4	Modifikation von Nukleinsäuren .....	20
2.4.4.1	Restriktion von DNA-Stücken.....	20
2.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	20

## Inhaltsverzeichnis

---

2.4.5.1	Standard-PCR .....	20
2.4.5.2	Linker-PCR.....	22
2.4.6	Ligation von DNA-Stücken.....	22
2.4.6.1	Standard-Ligierung .....	22
2.4.6.2	Ligation von PCR-Amplifikaten mittels T-Vector nach Promega .....	22
2.4.7	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen.....	23
2.4.7.1	Herstellung kompetenter Zellen für Hitzeschocktransformation.....	23
2.4.7.2	Hitzeschocktransformation .....	23
2.4.8	Molekularbiologische Herstellung von Antikörpern .....	24
<b>2.5</b>	<b>In-situ-Hybridisierung (ISH) .....</b>	<b>26</b>
2.5.1	In-vitro-Transkription zur Herstellung der cRNA-Sonden.....	26
2.5.2	In-situ-Hybridisierung mit cRNA-Sonden.....	27
<b>2.6</b>	<b>Proteinchemische Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.6.1	Induktion von Fusionsprotein .....	29
2.6.1.1	Induktion von BL 21 (DE3) pLysS-Zellen mit Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) .....	29
2.6.1.2	Induktion von XL1-blue-Zellen mit M13/T7-Phagen .....	30
2.6.1.2.1	Aufarbeiten der Phagen .....	30
2.6.1.2.2	Titerbestimmung der M13/T7-Phagen.....	30
2.6.1.2.3	Induktionsvorgang .....	31
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	31
2.6.3	Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen (Western Blot).....	32
2.6.4	Nachweis spezifischer Proteinbanden .....	33
2.6.4.1	Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern gegen Tetra- bzw. Penta-Histidin .....	33
2.6.5	Affinitätsreinigung von Antikörpern .....	34
2.6.6	Dot-Blot-Analyse.....	34
<b>2.7</b>	<b>Immunologische und immunhistochemische Methoden .....</b>	<b>35</b>
2.7.1	Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung von Antikörpern .....	35
2.7.1.1	Kopplung von Peptiden an Trägermoleküle .....	35

## Inhaltsverzeichnis

---

2.7.1.1.1	Kopplung an Ni-NTA-Agarose für s.c.-Immunsierung.....	35
2.7.1.1.2	Kopplung an Ovalbumin für s.c.-Immunsierung.....	35
2.7.1.1.3	Adsorption von Peptiden an Bentonite für i.v.-Immunsierung....	36
2.7.1.2	Immunsierungsschema .....	36
2.7.2	Antigenkompetition .....	37
2.7.3	Semidünnschnittpräparate.....	37
2.7.4	Kryostatschnitte .....	37
2.7.5	Immunfluoreszenzinkubation .....	38
2.7.6	Enzym-gekoppelter Immunadsorptions Test (ELISA).....	38
<b>3</b>	<b><i>Ergebnisse</i></b> .....	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>In-situ-Hybridisierung (ISH)</b> .....	<b>40</b>
3.1.1	Herstellung der Antisense- und Sense-Sonden .....	40
3.1.2	Anwendung der hergestellten Sonden an Zungengewebe der Ratte.....	41
<b>3.2</b>	<b>Antikörperherstellung</b> .....	<b>43</b>
3.2.1	Antikörperherstellung gegen Peptide als Antigen .....	43
3.2.1.1	Auswahl der Peptide und Immunsierung.....	43
3.2.1.2	Testen des gewonnenen Kaninchenserums.....	44
3.2.1.3	Immunfluoreszenz unter Anwendung des Vollserums .....	45
3.2.1.4	Immunfluoreszenz mit affinitätsgereinigten Antikörpern .....	45
3.2.2	Inhibitionsversuche .....	46
<b>4</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>53</b>
<b>5</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>59</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>61</b>

***Danksagung***

***Lebenslauf***

## 1 Einleitung

Säugetiere haben im Laufe der Evolution drei verschiedene Sensorsysteme zur Wahrnehmung und Prüfung ihrer chemischen Umwelt, sowie für die Umwandlung dieser Sinneseindrücke in spezifische Muster neuronaler Aktivität, entwickelt.

Zum einen das Riechepithel, welches im hinteren oberen Bereich der Nasenhöhle lokalisiert ist und zur Erkennung kleiner, flüchtiger chemischer Verbindungen dient. Desweiteren das Vomeronasalorgan (VNO) des Nasenseptums, das auf die Wahrnehmung von Pheromonen spezialisiert ist. Schließlich das Geschmacksepithel, welches unmittelbar die chemischen Eigenschaften der aufgenommenen Nahrung überprüft.

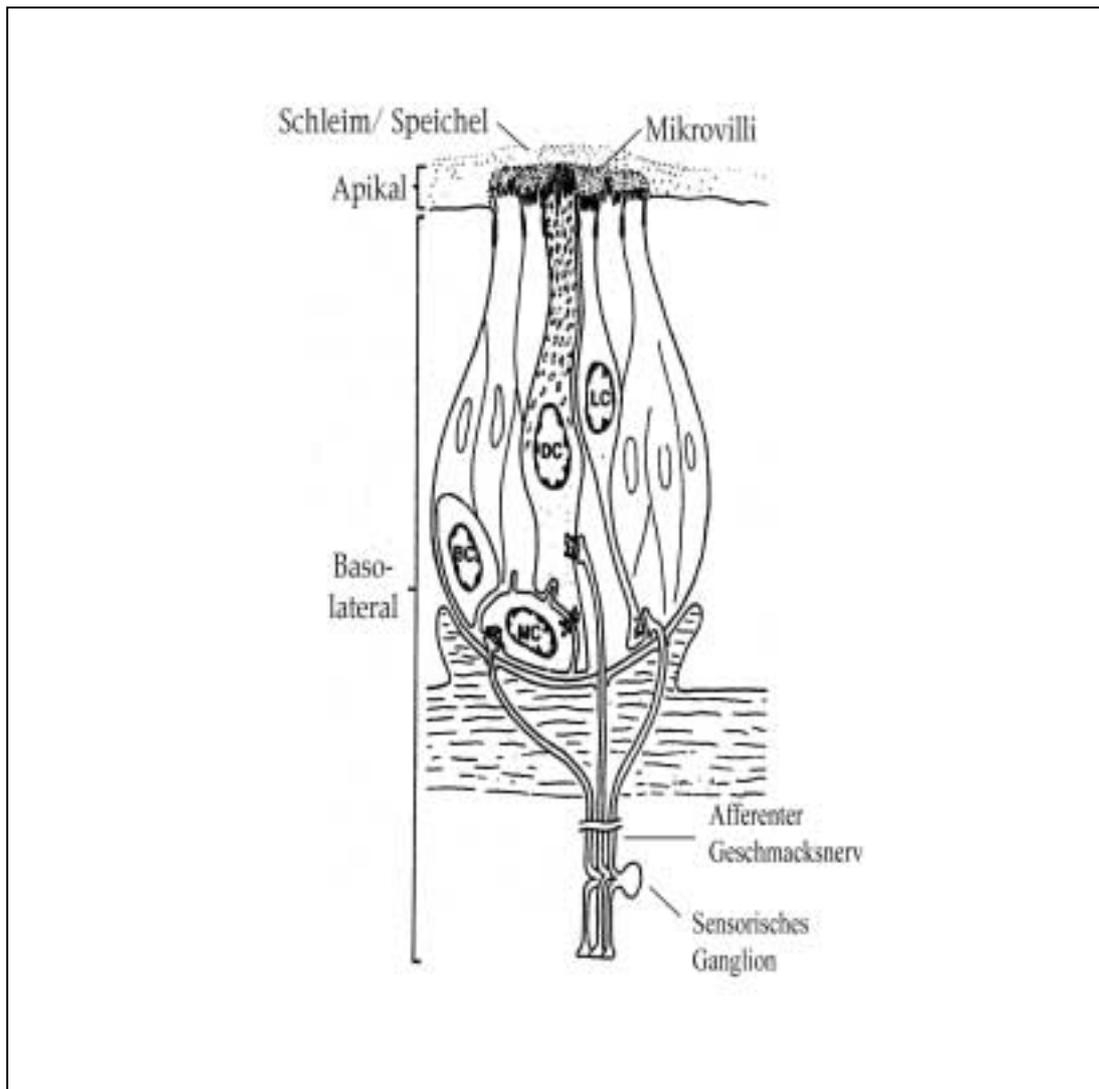
### 1.1 Anatomische Grundlagen der Geschmackswahrnehmung

*Kölliker* (1855) erkannte, dass der Ort der Geschmackswahrnehmung über einen großen Bereich innerhalb der Mundhöhle, sowie des Pharynx verteilt ist. Entgegen der Meinung, freie Nervenendigungen seien für das Schmecken verantwortlich (Übersicht bei *Baradi* und *Bourne*, 1953), konnten Geschmacksrezeptorzellen, welche zu zwiebelartigen, zellulären Einheiten, den Geschmacksknospen (*Caliculi gustatorii*) zusammengefasst sind, als erstes Glied in der Kette der Erkennung verschiedener Geschmacksstoffe identifiziert werden (*Kölliker*, 1855; *Murray*, 1971). Beim Menschen sind zirka 2/3 dieser Geschmacksknospen in drei speziellen Papillen der Zunge untergebracht (siehe auch Abbildung 1.3):

- a) in den pilzförmigen Papillen (*Papillae fungiformes*), welche beim Menschen vermehrt an Zungenrand und -spitze vorkommen. Da sie in der Regel nicht verhornt sind, erscheinen sie als mit bloßem Auge sichtbare rötliche Pünktchen auf dem Zungenrücken. Neben der Geschmacksempfindung sind sie außerdem an der Thermo- und Mechanorezeption beteiligt.
- b) in den Blattpapillen (*Papillae foliatae*), die beim Menschen nur undeutlich im hintersten lateralen Teil der Zunge ausgebildet sind und dort eine Gruppe schräg abwärts verlaufender Rinnen bilden.
- c) in den 7-12 -bei Mäusen und Ratten hingegen nur einer- Wallpapillen (*Papillae circumvallatae*), die als die größten Papillen in einer Reihe unmittelbar vor dem Sulcus

## Einleitung

terminalis stehen. Am Grunde des Wallgrabens münden die von Ebnerschen Spül-  
drüsen, seröse Drüsen, die mit ihrem dünnflüssigen Sekret den Wallgraben von Ge-  
schmacksstoffen freispülen und Bindeproteine für hydrophobe Geschmacksstoffe  
sind.



**Abbildung 1.1**

Schemazeichnung einer Geschmacksknospe; aus *Kinnamon* und *Cummings* (1992)

DC= Dunkle Zelle (dark cell), LC= Helle Zelle (light cell), BC=Basalzelle, MC= Merkel-ähnliche Zelle (Zelltyp III)

Etwa 1/3 der Geschmacksknospen befinden sich nicht auf der Zunge, sondern sind im

## Einleitung

---

Bereich des weichen Gaumens, sowie der Epiglottis lokalisiert. Im Laufe des Lebens nimmt die Gesamtzahl aller Geschmacksknospen stetig ab (Arey *et al.*, 1935). Die Innervation der Geschmacksknospen der vorderen 2/3 der Zunge erfolgt durch den Nervus intermediofacialis, im hintere Zungendrittel durch den Nervus glossopharyngeus (Herness und Gilbertson, 1999). Die pharyngeal angesiedelten werden durch den Nervus vagus innerviert (Nelson, 1998).

Die Geschmacksknospen besitzen einen transversalen Durchmesser von 20-40  $\mu\text{m}$  und eine Länge von 40-60  $\mu\text{m}$  (Herness und Gilbertson, 1999). Im apikalen Bereich befindet sich eine Geschmackspore, deren Durchmesser sich auf 4-10  $\mu\text{m}$  beläuft (Simon und Roper, 1993). Basal erlauben Lücken der Basallamina, die sogenannten Basalporen, den Durchtritt für Nervenfasern (Royer und Kinnamon, 1988). Diese stehen über Synapsen mit den Geschmacksrezeptorzellen in Verbindung (Lindemann, 1996), oder entsenden freie Nervenendigungen zwischen die einzelnen Zellen einer Geschmacksknospe. Als Botenstoffe im synaptischen Spalt werden Acetylcholin, Serotonin und  $\alpha$ -Dopa diskutiert (Azzali, 1997). Aufgebaut ist die Geschmacksknospe aus zirca 50-150 Zellen (Kinnamon und Cummings, 1992), die sich in eine Gruppe von Geschmacksrezeptorzellen, Stützzellen und Basalzellen (Roper, 1989) unterteilen läßt. Die Lebensdauer einer Geschmacksknospe beträgt zwischen 10-14 Tagen (Margolskee, 1993). Untereinander sind die Zellen über Zonulae occludentes verbunden, die gewährleisten, dass Geschmacksstoffe nur die in die Geschmackspore reichenden Mikrovilli einiger Geschmacksrezeptorzellen, nicht aber tiefer gelegene Strukturen, erreichen (Kinnamon, 1996). Diese Mikrovilli, welche zu einer Vergrößerung der Zelloberfläche führen, werden mit den in der Zellmembran liegenden Rezeptoren und Ionenkanälen als das erste Glied der Geschmackswahrnehmung angesehen (Kinnamon, 1996). Innerhalb der Geschmacksrezeptorzellen lassen sich nach der von Farbman (1965), Murray (1971), Delay *et al.* (1986) und Reutter und Witt (1993) begründeten allgemein gebräuchlichen Nomenklatur vier verschiedene Zelltypen unterscheiden (siehe Tabelle 1.1).

## Einleitung

Zelltyp	Beschreibung	Häufigkeit	Zellaufbau	Spezies	putative Fkt.
I	Dunkle Zelle	65%	apikaler Zellpol reicht in G.p.; zahlreiche lange und dünne M.v., reich an Mikrofilamenten; basaler Pol an B.l.; dunkles Protoplasma, rER, eingezogener Nucleus	Maus, Hase	Geschmackswahrnehmung (wenn Synapse vorhanden), Sekretion
	Intermediäre Zelle	<10%	wie dunkle Zelle; Zytoplasma etwas heller	Maus	Geschmackswahrnehmung (wenn Synapse vorhanden)
II	Helle Zelle	20%	apikaler Zellpol reicht in G.p.; wenige kurze, dicke M.v.; basaler reicht nicht an B.l.; Protoplasma hell mit Vacuolen, ER; großer, runder Kern	Maus, Guinea Schwein, Hase	Geschmackswahrnehmung (wenn Synapse vorhanden)
III	Serotonerge Zelle	<10%	apikaler Zellpol reicht an G.p., fehlen von M.v.; basaler Zellpol nicht an B.l.; Bündel von Intermediärfilamenten; Transportvesikel; rER; spezialisierte Kerne	alle	Geschmackswahrnehmung; event. Assoziation zu Merkel-Zellen der Haut
IV	Basalzelle	5%	runde Zellen entlang der B.l.; Intermediärfilamente nahe des Kernes	alle	Stammzellen

**Tabelle 1.1**

Beschreibung der unterschiedlichen Geschmacksrezeptorzellen

G.p.= Geschmackspore, B.l.= Basallamina, M.v.= Mikrovilli, rER= raues endoplasmatisches Retikulum

modifiziert nach *Lindemann* (1996), Angaben über Mikrovilli ergänzt nach *Höfer* und *Drenckhahn* (1999)

## 1.2 Die fünf Geschmacksqualitäten

(nach *Gilbertson et al.*, 2000; *Herness* und *Gilbertson*, 1999; *Kinnamon*, 1996; *Lindemann*, 2001; *Lindemann*, 1996; *Smith* und *Margolskee*, 2001; *Stewart et al.*, 1997)

Die große Bandbreite an unterschiedlichsten Geschmacksstoffen wird im Menschen



### 1.2.1 Ionenkanal-vermittelte Geschmackswahrnehmung

#### Sauer:

Saure Geschmacksstoffe, in Form von  $H^+$ -Ionen, strömen durch amilorid-abhängige Ionen-Kanäle der (deg)/ENaC-Superfamilie. Dies führt zu einem Verschluss apikaler  $K^+$ -Kanäle und somit zu einer Depolarisation des Membranpotentials der Geschmacksrezeptorzelle. Über diesen Mechanismus der Depolarisation führt auch die durch Protonen vermittelte Aktivierung von Kationen-Kanälen. Desweiteren trägt eine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes, der direkt durch den  $H^+$ -Ionen-Einstrom hervorgerufen wird dazu bei, einen Geschmacksstoff als „sauer“ wahrzunehmen.

L-Arginin hingegen aktiviert Glutamat-abhängige ionotrope Rezeptoren, welche durchlässig für Kationen werden. Dies führt zu einer Depolarisation des Membranpotentials der Geschmacksrezeptorzelle und somit zur Öffnung spannungsabhängiger  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Über den Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen erfolgt die Exozytose von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt.

#### Salzig:

Ähnlich dem molekularen Mechanismus der oben genannten sauren Geschmackswahrnehmung führt der Einstrom von  $Na^+$ -Ionen durch Kanäle der (deg)/ENaC-Superfamilie zu einer direkten Depolarisation der Zelle.

### 1.2.2 Rezeptor-vermittelte Geschmackswahrnehmung

#### Süß:

Zuckerstoffe führen in Geschmacksrezeptorzellen zu einer G-Protein-abhängigen Aktivierung der Adenylatzyklase und dadurch zu einer Erhöhung von cAMP. Die Aktivierung der Adenylatzyklase erfolgt über Bindung der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins Gustducin. Gustducin ist dem Transducin nahe verwandt (*McLaughlin et al.*, 1992) und spielt bei der Geschmackswahrnehmung von „süß“ und „bitter“ eine entscheidene Rolle (*McLaughlin et al.*, 1992; *Ruiz-Avila et al.*, 2001; *Wong et al.*, 1996). Das vermehrt gebildete cAMP führt über eine von Proteinkinase A abhängige Phosphorylierung zum Verschluss apikaler  $K^+$ -Kanäle. Zum anderen wird durch das cAMP ein Kationeneinstrom ( $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ) durch cAMP gesteuerte Kanäle erreicht. Aus beiden Mechanismen resultiert eine Depolarisation des Membranpotentials mit Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen

## Einleitung

---

aus dem extrazellulären Raum und Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt.

Künstliche Süßstoffe wie Saccharin und SC45647 führen IP<sub>3</sub>-vermittelt zu einer Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca<sup>2+</sup>-Ionen und somit zu einer Neurotransmitterfreisetzung.

### Bitter:

Bitterstoffe wie Denatoniumbenzoat oder 6-n-Propyl-2-thiouracil (PROP) führen über die  $\alpha$ -Untereinheit von Gustducin zu einer Aktivierung einer Phosphodiesterase. Hieraus ergibt sich eine Abnahme von intrazellulärem cAMP und eventuell über die Aufhebung einer durch zyklische Nukleotide (cNMP) vermittelten Kanal-Blockade ein Einstrom von Ca<sup>2+</sup>-Ionen in die Geschmacksrezeptorzelle. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit von Gustducin führt wahrscheinlich über eine Phospholipase C zu einer Erhöhung von IP<sub>3</sub> und somit zu einer Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Depots. Bei beiden Mechanismen bewirken die Erhöhung von intrazellulären Ca<sup>2+</sup> und die Freisetzung von Neurotransmittern aus der Zelle.

Andere bittere Geschmacksstoffe, wie Tetraethylammonium blockieren K<sup>+</sup>-Kanäle und führen zu einer Depolarisation und Entleerung intrazellulärer Ca<sup>2+</sup>-Speicher.

### Umami:

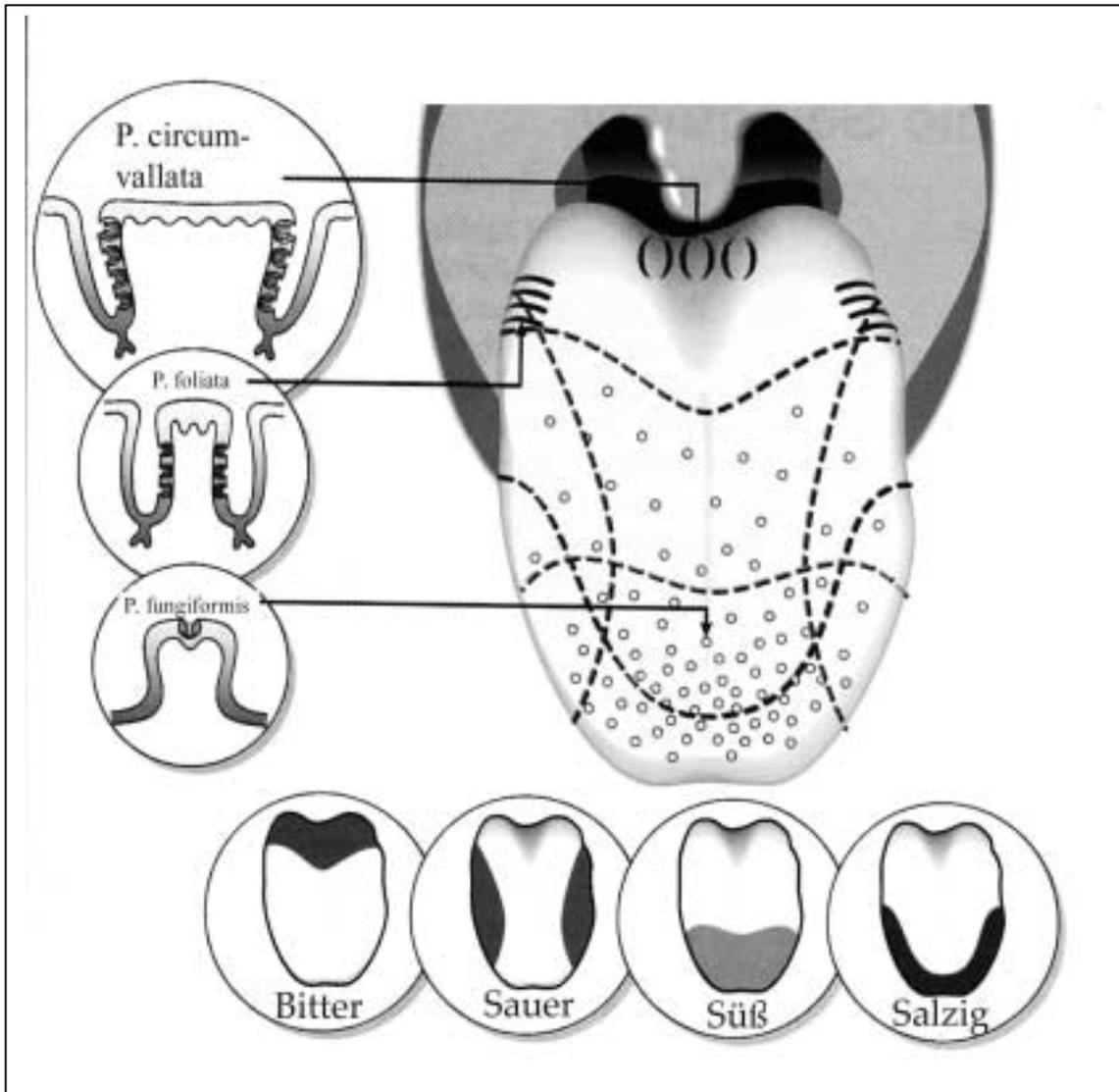
L-Glutamat führt ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Glutamatrezeptoren zu einer Aktivierung der Phosphodiesterase und somit zu einer Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels.

Über lange Zeit nahm man an, dass eine bestimmte Geschmacksqualität auf der Zunge nur in einem topographisch streng begrenzten Gebiet wahrgenommen werden kann. Jede Geschmacksrezeptorzelle sollte nur für die Rezeption einer Geschmacksqualität verantwortlich sein. Da sich zahlreiche Autoren noch auf dieses veraltete Modell beziehen und es auch zum Verständnis dieser Arbeit beiträgt, ist es in Abbildung 1.3 erwähnt und erklärt.

Neuere Studien belegten jedoch, dass diese exakte Lokalisation einzelner Orte der Geschmackswahrnehmung nicht zutrifft (*Lindemann, 1999; Smith und Margolskee, 2001*) und dass einzelne Geschmacksrezeptorzellen mehrere verschiedene Geschmacksstoffe

## Einleitung

wahrnehmen können (Adler *et al.*, 2000; Caicedo und Roper, 2001; Gilbertson *et al.*, 2001; Lindemann, 2001).



**Abbildung 1.3**

Veraltete Darstellung der Verteilung der Geschmacksempfindungen auf der Zunge, nach der einzelne Geschmacksqualitäten nur in bestimmten Bereichen der Zunge wahrgenommen werden. Diese Darstellung ist nicht korrekt, da auf jeder Stelle des Zungenrückens alle Geschmacksqualitäten wahrgenommen werden können. Die Darstellung berücksichtigt nur Schwerpunktareale bestimmter Qualitäten.

aus Hoon *et al.* (1999)

### 1.3 Die T1R-Geschmacksrezeptorfamilie

Nach dem heutigen Stand der Forschung umfaßt die Gruppe der T1R drei unterschiedliche Geschmacksrezeptoren, nämlich T1R1 und T1R2 (*Hoon et al.*, 1999), sowie T1R3 (*Kitagawa et al.*, 2001; *Max et al.*, 2001; *Montmayeur et al.*, 2001; *Sainz et al.*, 2001). Sie gehören zur Untergruppe 3 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und zeigen somit eine enge Verwandtschaft zu anderen Mitgliedern dieser Familie: den Pheromonrezeptoren V2R (*Herrada und Dulac*, 1997; *Matsunami und Buck*, 1997; *Ryba und Tirindelli*, 1997), der Gruppe von Kalzium-empfindlichen Rezeptoren (CaSR) (*Brown et al.*, 1993), der GABA<sub>B</sub>-Rezeptorgruppe (*Kaupmann et al.*, 1997), einer Gruppe von Pheromonrezeptoren der Fische (*Cao et al.*, 1998; *Naito et al.*, 1998; *Specca et al.*, 1999), sowie mit einer Gruppe von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR) (*Chandhari et al.*, 2000; *Nakanishi*, 1992).

Folgende Charakteristika kennzeichnen die Familie der T1R's:

- a) zwischen den DNA-Sequenzen von T1R1, T1R2 und T1R3 und denen anderer Vertretern aus der GPCR-Gruppe bestehen Sequenzhomologie bis zu 30% (*Hoon et al.*, 1999)
- b) alle diese Rezeptoren zeichnen sich durch sieben transmembranäre Domänen aus
- c) der extrazelluläre Bereich enthält neun konservierte Cystein-reiche Sequenzen (*Okamoto et al.*, 1998)
- d) der N-terminal gelegene extrazelluläre Abschnitt ist besonders groß und läßt die Funktion einer Ligandenbindungsstelle vermuten (*Takahashi et al.*, 1993; *Kunishima et al.*, 2000).

Innerhalb der T1R-Rezeptorengruppe, welche auf DNA-Ebene durch sechs Exons codiert wird (*Montmayeur et al.*, 2001), bestehen große Aminosäure (AS)-Homologien. Fünf dieser Exons codieren den langen extrazellulären Abschnitt der Rezeptoren. T1R1 und T1R2 besitzen eine AS-Identität von 40%, T1R1 und T1R3 von 32% und T1R2 mit T1R3 von 30%. Die Sequenzhomologien von T1R1, T1R2 und T1R3 der Maus liegen bezogen auf die der menschlichen Sequenzen bei ungefähr 70%.

Bisher konnte mittels In-situ-Hybridisierung, sowie der Anwendung von spezifischen Antikörpern gegen die Rezeptoren T1R1, T1R2 und T1R3 Aussagen über deren Vertei-

## Einleitung

lung in den einzelnen Geschmacksknospen der unterschiedlichen Geschmackspapillen gemacht werden (siehe Tabelle 1.2). Außerhalb der Zunge konnte unter Verwendung dieser Techniken keiner der drei Geschmacksrezeptoren bislang gefunden werden. T1R3-DNA jedoch wurde mittels RT-PCR auch im Hoden nachgewiesen (*Kitagawa et al.*, 2001), einem Organ welches auch andere Geschmacksrezeptoren (*Matsunami et al.*, 2000) und Geruchsrezeptoren (*Ninomiya und Funakoshi*, 1993) exprimiert. Welche Funktionen diese Rezeptoren im Hoden besitzen ist noch unklar. Eventuell dienen sie der Chemorezeption von Spermien.

	Papillae circumvallatae	Papillae foliatae	Papillae fungiformes
T1R1	<10%	10%	20- 30%
T1R2	20- 30%	20- 30%	5%
T1R3	24%	14%	15%

### **Tabelle 1.2**

Angaben über die mittels In-situ-Hybridisierung (ISH) detektierten positiven Geschmacksrezeptorzellen in den verschiedenen Geschmackspapillen.

nach *Hoon et al.* (1999), *Montmayeur et al.* (2001)

Doppel-In-situ-Hybridisierungen unter der Anwendung von Antisense-Sonden spezifisch für T1R-Geschmacksrezeptoren sowie für Gustducin, zeigten die in Tabelle 1.3 angegebenen Verteilungshäufigkeiten.

	T1R1	T1R2	T1R3
Gustducin	15% / 20%	15% / 10%	10- 20% / 10%

### **Tabelle 1.3**

Angaben über die prozentuale Verteilung -bei Untersuchungen mittels Doppel-In-situ-Hybridisierung- der Coexpression von Gustducin und den einzelnen T1R-Geschmacksrezeptoren; die erste Zahlenangabe bezieht sich auf die prozentuale Häufigkeit von T1R-Expression in Gustducin-positiven Geschmacksrezeptorzellen, die zweite auf die Häufigkeit von Gustducin in Zellen, die eine positive Reaktion für die jeweiligen Geschmacksrezeptoren zeigten.

aus *Hoon et al.* (1999), *Montmayeur et al.* (2001)

Durch In-situ-Hybridisierung konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die beiden Rezeptoren T1R2 und T1R3 stets zusammen in einer Geschmacksrezeptorzelle der drei verschiedenen Geschmackspapillen exprimiert werden. T1R1 und T1R3 jedoch, wenn überhaupt, werden nur in den Zellen der Papillae fungiformes koexprimiert (*Nelson et al.*, 2001). T1R1 und T1R2 sind in einigen wenigen Rezeptorzellen zusammen exprimiert.

Heute geht man davon aus, dass die T1R-Geschmacksrezeptorfamilie das erste Glied bei der Geschmackswahrnehmung „süß“ darstellt. Dies widerlegt die von *Hoon et al.* (1999) postulierte Vorstellung, der bezogen auf das topographische Zungenmodell (siehe Abbildung 1.3) und der Verteilungshäufigkeiten der Rezeptoren, T1R2 zu den Bitter-Rezeptoren und nur T1R1 zu den Süß-Rezeptoren zählt.

Diese These kann durch mehrere Forschungsergebnisse gestützt werden:

- a) Alle drei T1R-Geschmacksrezeptoren haben ihren Genort bei der Maus auf dem kurzen Arm von Chromosom 4. Beim Menschen liegt dieser Ort auf Chromosom 1p36. Dieser auch als „Sac-Locus“ (englisch: saccharin preferring) bekannte Ort (*Bachmanov et al.*, 1997; *Blizard et al.*, 1999; *Li et al.*, 2001) codiert für die Unterscheidungsfähigkeit von verschiedenen süßen Stoffen bei der Maus (*Capeless* und *Whitney*, 1995; *Fuller*, 1974; *Lush*, 1989; *Lush et al.*, 1995). *Li et al.* (2001) stellte diese Behauptung bezogen auf T1R1 jedoch in Frage.
- b) Mäuse, bei denen der T1R3- Rezeptor durch Austausch von sechs Aminosäuren verändert wurde, zeigten keinerlei Reaktion auf süße Geschmacksstoffe mehr (*Montmayeur et al.*, 2001; *Nelson et al.*, 2001).
- c) Alle drei Geschmacksrezeptoren der T1R-Familie können der Untergruppe 3 der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zugeordnet werden, die bei der Geschmackswahrnehmung „süß“ eine entscheidende Rolle spielt (siehe auch Abschnitt 1.2).

## 1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die zu Dissertationsbeginn bekannten Geschmacksrezeptoren T1R1 und T1R2 auf RNA-Ebene unter Anwendung der In-situ-Hybridisierung (ISH) nachzuweisen.

## Einleitung

---

Desweiteren sollte versucht werden durch die molekularbiologische Herstellung von T1R1- und T1R2-Fusionsproteinen Antigene für die Generierung von Antikörpern gegen diese beiden Rezeptoren zu erhalten.

Parallel hierzu sollten Antikörper unter Anwendung von Peptiden gegen T1R1 und T1R2 hergestellt werden.

Während *Hoon et al.* (1999) Peptid-Antikörper nur gegen den intrazellulär gelegenen C-terminalen Abschnitt des Geschmacksrezeptors T1R1 und seinen Anti-Fusionsprotein-Antikörper gegen einen Abschnitt des extrazellulären N-terminalen Schwanzes des Rezeptors T1R2 richtete, sollten für beide Rezeptoren sowohl Peptid-, als auch Anti-Fusionsprotein-Antikörper gegen die extrazelluläre Domäne hergestellt werden.

Da das  $\alpha$ -Gustducin, wie aus Tabelle 1.3 ersichtlich, zusammen mit T1R1 und T1R2 in einer Geschmacksrezeptorzelle koexprimiert werden kann, auch im Magen (*Höfer et al.*, 1996) und im Pancreasgang (*Höfer und Drenckhahn*, 1998) nachgewiesen werden konnte, sollte versucht werden, die beiden Geschmacksrezeptoren T1R1 und T1R2 auch außerhalb des Zungengewebes und hier vornehmlich in Gewebe des Gastrointestinaltraktes nachzuweisen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Lösungen und Materialien

10x TBE-Puffer	108 g Tris 55 g Borsäure 9,3 g EDTA pH 8,3 einstellen
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0
PBS	137 mM NaCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
LB-Medium	10 g Casein-Hydrolysat (Bacto-Tryptone) 5 g Hefe-Extrakt (Bacto-Yeast) 10 g NaCl ad 1l mit H <sub>2</sub> O, pH 7,5 einstellen
LB-Agar	10 g Casein- Hydrolysat (Bacto-Tryptone) 5 g Hefeextrakt (Bacto-Yeast) 10 g NaCl 15 g Agar ad 1l mit H <sub>2</sub> O, pH 7,5 einstellen

### 2.2 Lebendmaterialien

Tiere: Kaninchen (Stamm New Zealand white)

Bakterienstämme: E.coli DH5 $\alpha$ , E.coli XL1-blue, E.coli BL21 (DE3) pLysS

E.coli JM 109

## 2.3 Nukleinsäuren

### 2.3.1 Plasmide

pGEM<sup>®</sup>-T Vector (Promega, Madison, USA)

Größe: 3003bp, Resistenz: Ampicillin

Dieser Vector erlaubt die Ligation von PCR-Produkten mit einem A-Überhang und enthält seine Multiple cloning site (MCS) zwischen einem T7- und SP6- Promotor.

pRSET A-Vector, pRSET B- Vector (Invitrogen, Leek, Niederlande)

Größe: 2939bp, Resistenz: Ampicillin

Diese Vektoren dienen als eukaryontische Expressionsvektoren und enthalten eine durch einen T7-Promotor begrenzte MCS. Unmittelbar vor der MCS befindet sich ein Poly-His-Schwanz aus sechs Histidinen. Dieser wird zusammen mit der eingefügten Sequenz exprimiert und dient zur Aufreinigung und Detektion. Die Vektoren unterscheiden sich in der unterschiedlichen Anordnung der gleichen Restriktionsendonukleasen und somit in ihrem Leseraster („reading frame“).

pGEX 4T-1 (Pharmacia Biotech, Freiburg)

Größe: 4969bp, Resistenz: Ampicillin

Dieser Vector dient ebenso als eukaryontischer Expressionsvector und enthält eine durch einen T7-Promotor begrenzte MCS. Unmittelbar vor der MCS steht eine GST-Sequenz, welche mitexprimiert wird und so zur Aufreinigung und Detektion dient.

pBluescript<sup>®</sup> II SK (+/-) (Stratagene, La Jolla, USA)

Größe: 2958bp, Resistenz: Ampicillin

In der vorliegenden Arbeit dient dieser Vector als Ausgangsvector für die Herstellung der cRNA-Sonden bei der In-situ-Hybridisierung, da die enthaltene MCS von T3- und T7-Promotoren begrenzt werden, welche spezifisch von T3-RNA- und T7-RNA- Polymerasen spezifisch erkannt werden.

### 2.3.2 Nukleinsäure-Größenmarker

100bp DNA Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Ein vollständiger Verdau von pMLX DNA durch Eco 147I und PvuI erzeugt die folgenden Fragmente:

## Material und Methoden

---

1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 (Größe in bp)

Fermentas-DNA-Marker (MBI Fermentas, St. Leon- Rot)

Ein vollständiger Verdau von  $\lambda$ -Phage, Wildtyp durch Eco91I erzeugt die folgenden Fraente:

8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702 (Größe in bp)

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 DNA-Gewinnung

#### 2.4.1.1 Plasmid-Minipräp

1,5 ml einer angeimpften Übernachtskultur (3-5 ml LB-Medium mit selektionierendem Antibiotikum) werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und für ca. 1 min in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 100  $\mu$ l GTE-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 200  $\mu$ l NaOH/SDS-Lösung hinzugefügt und der Inhalt einige Male vorsichtig invertiert und bei RT stehengelassen, bis die Lösung klar ist (dieser Vorgang darf jedoch nicht länger als 5 min dauern). Nach Hinzufügen von 150  $\mu$ l KAc-Lösung und erneutem Invertieren wird der Ansatz für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren wird der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend werden 7/10 des Reaktionsvolumens an Isopropanol hinzugefügt und erneut bei RT für 10-15 min inkubiert. Durch Zentrifugieren für 15 min und Verwerfen des Überstandes entsteht ein DNA enthaltendes Pellet, welches mit 300  $\mu$ l 70%-tigem EtOH gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert wird. Das DNA-Pellet wird dann luftgetrocknet und in 50  $\mu$ l TE oder TE-RNaseA aufgenommen.

#### GTE-Puffer:

50 mM Glucose; 25 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; RNaseA 10 $\mu$ l/ml

#### KAc-Lösung:

60 ml 5 M Kalium-Acetat; 11,5 ml Eisessig; 28,5 ml H<sub>2</sub>O

NaOH/SDS-Lösung: (vor Gebrauch immer frisch ansetzen):

0,2 N NaOH; 1% SDS

### 2.4.1.2 Plasmid-Minipräparation nach Qiagen

QIAprep Miniprep-Kit (Qiagen, Hilden)

1,5 ml einer Übernachtskultur werden für 10 min bei 6000 rpm zentrifugiert und das Bakteriensediment in 250 µl Puffer P1 resuspendiert, anschließend mit 250 µl Puffer P2 versetzt und vorsichtig invertiert. Es ist darauf zu achten, dass dieser Arbeitsschritt nicht länger als 5 min in Anspruch nehmen darf. Nach der Zugabe von 350 µl Puffer N3 und erneutem Invertieren, wird der Ansatz für 10 min abzentrifugiert und der Überstand in eine bereitgestellte „QIAprep spin column“ gegeben. Nach einem Zentrifugieren für 1 min und Verwerfen des Durchflusses wird die Säule mit 0,5 ml Puffer PB gewaschen. Nach einminütigem Abzentrifugieren und Verwerfen des Durchflusses wird die Säule mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen. Nun wird erneut für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluß verworfen und nochmals zentrifugiert, um sicher zu stellen, dass sämtlicher Waschpuffer entfernt wurde. Anschließend platziert man die „QIA spin column“ in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, pipettiert 50 µl H<sub>2</sub>O in das Zentrum der Säule und eluiert mittels Zentrifugation für 1 min die Plasmid-DNA.

Puffer P1:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA

Puffer P2:

200 mM NaOH; 1% SDS

Puffer N3:

3,0 M NaCl, pH 5,5

Puffer PB:

750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol; 0,15% Triton X-100

Puffer PE:

1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol

### 2.4.1.3 Plasmid-Großpräparation nach Qiagen

QIAprep Maxiprep-Kit (Qiagen, Hilden)

Eine Übernacht-Starterkultur (3-5 ml LB-Medium mit selektionierendem Antibiotikum) wird zu 100 ml LB-Medium (Antibiotikum hinzugeben) gegeben und erneut als Übernachtskultur wachsen gelassen. Die entstandene Großkultur wird in JA 10- Zentrifugenbechern 15 min bei 6000 rpm und 4°C in einer Beckmann-Kühlzentrifuge zentrifugiert.

## Material und Methoden

---

Daraufhin wird das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und mit 10 ml Puffer P2 versetzt. Nach vorsichtigem mehrmaligen Invertieren (dieser Schritt darf nicht länger als 5 min brauchen), wird der Ansatz mit 10 ml vorgekühltem Puffer P3 invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgt eine Zentrifugation für 30 min. Der Überstand wird nun über einen Faltenfilter in eine mit 10 ml QBT äquilibrierte QUIAGEN-tip 500-Säule gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 30 ml QC-Puffer wird die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer in ein JA 20- Röhrchen eluiert und mit 10,5 ml Isopropanol versetzt. Nach gründlichem Vermischen des Ansatzes wird dieser bei 15000 rpm und 4°C erneut abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das DNA-Pellet wird mit 70%-tigem EtOH gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl TE gelöst.

### Puffer P1:

50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; pH von 8,0 einstellen und RNaseA (f.c. 100µg/ml) hinzugeben; Lagerung bei 4°C

### Puffer P2:

200 mM NaOH; 1% SDS

### Puffer P3:

3,0 M KAc, pH 5,5

### Puffer QBT:

750 mM NaCl; 50 mM MOPS; 15% Isopropanol; 0,15% TritonX-100; pH auf 7,0 einstellen

### Puffer QC:

1,0 M NaCl; 15% Isopropanol; 50 mM MOPS; 0,15% TritonX-100; pH auf 7,0 einstellen

### Puffer QF:

1, 25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 15% Isopropanol

### **2.4.1.4 DNA-Fragmentisolation aus Agarosegelen nach Genomed**

JET QUICK Gel Extraction-Kit (Genomed, Bad Oeyenhausen)

Unter UV-Licht (UV-Illuminator, Vetter GmbH, Wiesloch) wird die gewünschte Ethidiumbromid gefärbte Bande so exakt wie möglich mit sterilen Skalpellens aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Für je 100 mg des herausgeschnittenen DNA-Fragmentes fügt man 300 µl Puffer L1 hinzu und inkubiert diesen Ansatz für 15 min bei 50°C. Während dieser Inkubation wird der Ansatz etwa alle 3 min kurz auf einem Vortex (Genie 2™; Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz) gemischt. Es ist darauf zu achten, dass Gelstücke mit einem Gewicht >300 mg für 20-30 min inkubiert werden müssen, um ein

## Material und Methoden

---

vollständiges Auflösen der Agarose zu erreichen. Desweiteren darf eine JETQUICK-Säule nicht mit mehr als 400 mg schweren Agarosestücken oder 700 µl Reaktionsansatz beladen werden. Anschließend wird das Gemisch in eine JETQUICK- Säule gegeben und für 1 min zentrifugiert. Ein erneuter Waschschrift mit 500 µl Puffer L1 ist angezeigt, wenn das Gewicht des Agarosefragmentes 250 mg überschreiten sollte. Die Säule wird nun mit 700 µl Puffer L2 beladen, 5 min stehen gelassen und abzentrifugiert. Anschließend wird erneut für eine Minute zentrifugiert und die DNA durch Zentrifugieren für 2 min mit 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### Puffer L1:

NaClO<sub>4</sub>; Nac; TBE-solubilizer (nähere Angaben sind gesetzlich geschützt und konnten vom Hersteller nicht in Erfahrung gebracht werden)

### Puffer L2:

167 mM NaCl; 0,33 mM EDTA; 33 mM Tris/HCl; 30 ml EtOH; pH 7,5 einstellen

## 2.4.2 Reinigung von DNA

### 2.4.2.1 7,5 M Ammoniumacetatfällung

Zu der zu fällenden DNA-haltigen Lösung werden 3/10 des Reaktionsansatzes 7,5 M Ammoniumacetat hinzugefügt und anschließend mit 20/10 EtOH abs. (-20°C) versetzt. Nach gründlichem Vermischen der Lösungen wird diese für 30 min auf Eis inkubiert und danach für 15 min abzentrifugiert. Nachdem das Pellet mit 70%-tigem EtOH gewaschen wurde, wird die DNA luftgetrocknet und in der gewünschten Menge TE oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.4.2.2 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI)

Die DNA-haltige Lösung wird mit gleichem Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (25 : 24 : 1; Verwendung von TE-gesättigtem Phenol) versetzt, gründlich gemischt und für 5 min bei 12.000 g abzentrifugiert. Die im oberen Teil des Ansatzes entstehende wässrige Phase wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut mit Chloroform-Isoamylalkohol vermengt und zentrifugiert.

### 2.4.3 Analyse von Nukleinsäuren

#### 2.4.3.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können spektralphotometrisch auf der Grundlage des Lambert-Behrenschen Gesetzes ( $E = OD = I_0/I = \epsilon \cdot c \cdot d$ ) ermittelt werden. Mit Hilfe des Spektralphotometers Ultrospec II (Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt man die Extinktion bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration läßt sich unter Anwendung der folgenden Formel berechnen:

$$\text{Proben-Konzentration} = OD_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot X \text{ } \mu\text{g/ml}$$

X entspricht (bei einer  $OD_{260}$  von 1,0):

50  $\mu\text{g/ml}$  dsDNA

40  $\mu\text{g/ml}$  RNA oder ssDNA

20  $\mu\text{g/ml}$  Oligonukleotide

Der Reinheitsgrad läßt sich aus dem Quotienten  $OD_{260} / OD_{280}$  erschließen und sollte bei  $\geq 1,8$  liegen, während Kontaminationen zu niedrigeren Werten führen. Als Referenzwert der OD dient bei beiden Wellenlängen die Extinktion des jeweiligen reinen Lösungsmittels.

#### 2.4.3.2 Agaroseelektrophorese von DNA

Zur elektrophoretischen Größenauftrennung von DNA-Fragmenten werden 0,8%-1%-tige (w/v) Agarosegele verwandt (Agarose Ultrapure von Gibco, Paisley, Schottland). Als Laufpuffer dient 1x TBE; bei Elutionsgelen, 1x TA. 1/5-1/10 der DNA-Probe wird in ihrem jeweiligen Lösungsmittel mit 6x Probenpuffer (PP) 5:1 verdünnt und in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgt für ca. 1h bei 70V. Anschließend wird das Gel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt. Länge und Masse der einzelnen Ethidiumbromid-gefärbten Fragmente können anschließend unter UV-Licht im Vergleich zu einer Markerspür (2.3.2) bestimmt werden.

##### 6xProbenpuffer:

1 mM EDTA, pH 8,0; 50% Glycerol; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol

## 2.4.4 Modifikation von Nukleinsäuren

### 2.4.4.1 Restriktion von DNA-Stücken

Restriktionsendonukleasen vom Typ II sind bakterielle Enzyme, die zwei korrespondierende Phosphodiesterbindungen von dsDNA an palindromen Erkennungssequenzen spalten und dabei je nach Eigenschaft des Enzymes entweder ein 3'-OH- und ein 5'-überhängendes Ende („sticky ends“) erzeugen oder „gerade“ („blunt ends“) schneiden.

Die Restriktion von DNA erfolgt unter den vom Hersteller (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen (in der Regel 37°C).

Zusammensetzung eines Standardverdaues:

DNA-Lösung	1-2 µg
10x Restriktionspuffer	1/10 Volumen
Restriktionsenzym	5 U/µg DNA
H <sub>2</sub> O	ad mind. 10 µl

## 2.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

### 2.4.5.1 Standard-PCR

Um DNA-Abschnitte, welche zwischen zwei bekannten Sequenzbereichen liegen, zu amplifizieren, gebraucht man im Rahmen der PCR-Reaktion die enzymatische Aktivität der *Taq-Polymerase* aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. (Diese Polymerase besitzt keine Exonukleaseaktivität, d.h. Korrekturlesen ist nicht möglich. Ihr pH-Optimum liegt bei 9, das Temperaturoptimum bei 75°C. Sie benötigt Mg<sup>2+</sup> als Cofaktor). Hierfür müssen zunächst zwei geeignete Primer („Startersequenzen“) ausgewählt werden. Von diesen ausgehend erfolgt dann die Amplifikation. Bei der Auswahl ist zum einen darauf zu achten, dass sich die 3'-OH-Gruppen der Primer „gegenüberstehen“, die Primer also in unterschiedlicher, aufeinanderzulaufender Richtung verlängert werden. Zum anderen sollte die Schmelztemperatur der Primer annähernd gleich sein, um Schwierigkeiten bei der Wahl der Annealing-Temperatur zu umgehen, welche mit artifiziellen Veränderungen



## Material und Methoden

---

T1R2-pRSET A-A 5`> GCTA GCT AGC ATG GGT CCC CAG GCA AGG  
ACA <3`

T1R2-pRSET A-B 5`> GCCG GAA TTC TCA GAC CAC GCG CTC CCC CGA  
AAG <3`

### 2.4.5.2 Linker-PCR

Die Linker-PCR, als eine Abwandlung der PCR zu betrachten, enthält in ihren Primersequenzen, neben der zur DNA-Matrize homologen Sequenz, zusätzlich noch ein Matrizen fremdes Motiv. Bei diesem handelt es sich um eine Erkennungssequenz für eine Restriktionsendonuklease (2.4.4.1), die ansonsten in der DNA-Matrize nicht schneidet, für eine anschließende Ligation (2.4.6) aber von Nöten ist.

### 2.4.6 Ligation von DNA-Stücken

Unter Ligation versteht man die Verknüpfung zweier DNA-Fragmente. Dies geschieht üblicherweise durch die T4-Ligase.

#### 2.4.6.1 Standard-Ligierung

Allgemeiner Ansatz (in der Regel 10 µl):

Vector-DNA	100 ng
zu klonierende DNA	≥300 ng
10x Ligationspuffer	1 µl
T4-Ligase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Ansatz über Nacht bei 16°C reagieren lassen.

#### 2.4.6.2 Ligation von PCR-Amplifikaten mittels T-Vector nach Promega

pGEM<sup>®</sup>-T Vector Systems (Promega, Madison, USA)

Dieser Klonierungsvector, der an seinem Ende einen 3`-Thymidintriphosphatüberhang trägt, macht sich die fast 100%-tige Eigenschaft der *Taq-Polymerase* (2.4.5) zu nutze, welche an ihr PCR-Amplifikat (insert) ein zusätzliches Adenosintriphosphat hängt. Über diese beiden „sticky ends“ (von Vector und PCR-Produkt) ist eine Ligation möglich.

## Material und Methoden

---

Zur Errechnung des einzusetzenden Gewichtes von T-Vector und PCR-DNA für eine optimale Ligation, wurde die vom Hersteller angegebene Formel herangezogen:

$$[(\text{ng T-Vector} \cdot \text{kb insert}) \div \text{kb T-Vector}] \cdot X = \text{ng insert}$$

X entspricht dem Verhältnis von Insert zu Vector. Dieses reicht von 1:3 bis 6:1.

Der 10 µl Reaktionsansatz entspricht dem unter 2.4.6.1 beschriebenen, mit Ausnahme der Verwendung von 5 µl eines 2x Rapid Ligierungs-Puffers. Die Ligierung soll über Nacht bei 4°C reagieren.

### 2.4.7 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Zellen

#### 2.4.7.1 Herstellung kompetenter Zellen für Hitzeschocktransformation

1 ml einer Übernachtskultur der gewünschten Zellen, werden mit 50 ml LB-Medium versetzt und bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 0,5-0,6$  (2.4.3.1) wachsen gelassen. Daraufhin wird der Ansatz in 50 ml Greinerröhrchen (Greiner, Frickenhausen) gefüllt (ab diesem Schritt muß bei einer Umgebungstemperatur von 4°C gearbeitet werden) und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 10 min bei 2500 rpm abzentrifugiert, das Sediment in 25 ml 0,1 M  $MgCl_2$  pH 7,5 aufgenommen und vorsichtig resuspendiert. Es erfolgt ein weiterer Aktionsschritt (s. oben), wobei die Zellen diesmal in 5 ml 0,1 M  $CaCl_2$  /20% Glycerol aufgenommen und erneut vorsichtig resuspendiert werden. Der Ansatz wird nun zu 200 µl Aliquots portioniert und in flüssigem  $N_2$  schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei  $-70^\circ C$ . Zum Errechnen der Kompetenz wird eine bestimmte Menge eines bekannten Plasmides hitzeschock- transformiert. Durch Auszählen der gewachsenen Kolonien läßt sich dann die Kompetenz bestimmen.

#### 0,1 M $MgCl_2$ :

10,165 g  $MgCl_2$ ; ad 500 ml  $H_2O$ ; pH 7,5 mit 1 M MOPS, pH 8,0, einstellen

#### 0,1 M $CaCl_2$ / 20% Glycerol:

0,7351 g  $CaCl_2$ ; 10 ml Glycerol; ad 50 ml  $H_2O$ ; pH 7,2-7,6 einstellen

#### 2.4.7.2 Hitzeschocktransformation

Ein Aliquot der Empfängerzellen wird für 10 min auf Eis aufgetaut und mit 10 µl der

DNA (Ligationsansatz oder Plasmid-DNA) versetzt. Nun werden die Zellen für weitere 30 min auf Eis inkubiert, während sie etwa alle 5 min leicht -durch Ansnipsen des Eppendorf-Reaktionsgefäßes- vermenget werden. Nach einem Hitzeschock (42°C) von exakt 1,5 min werden die Ansätze erneut für 2 min auf Eis gestellt, bevor man 800 µl 37°C warmes LB-Medium hinzu pipettiert. Darauf folgt eine Inkubation auf einem Drehrad für 1 h bei 37°C. Nach einem kurzen Abzentrifugieren, Abnehmen von 800 µl des Überstandes und Resuspension der Zellen in den übrigbleibenden 200 µl, werden je 50 µl und 100 µl der Zellen auf LB-Agar-Platten (mit selektionierendem Antibiotikum) ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.4.8 Molekularbiologische Herstellung von Antikörpern

Am Beispiel der Klonierung des T1R1 in den Expressionsvector pGEX4T-1 soll die Vorgehensweise, sowie die versuchte Herstellung eines Fusionsproteins, welches als Antigen für eine Immunisierung dienen sollte, näher dargestellt werden. Die Klonierung des T1R2 in den pGEX4T-1, ebenso wie des T1R1 und T1R2 in den Expressionsvector pRSET A werden nur cursorisch, wesentliche Unterschiede jedoch genauer dargestellt.

#### T1R1-pGEX4T-1

Die von *Hoon et al.* (1999) veröffentlichte DNA-Sequenz von T1R1 und T1R2 diene als Grundlage für die Auswahl der Oligonukleotidprimer T1R1-pGEX-A und T1R1-pGEX-B. Die von der oben erwähnten Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellte DNA wurde durch eine PCR amplifiziert. Die so entstandenen Endprodukte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und durch Elution aus diesem extrahiert. Bei T1R1 handelt es sich um ein 600 bp großes DNA-Fragment, welches einen Teil des N-terminalen Abschnitts der extrazellulären Domäne umfaßt. Um sicher zu gehen, dass die freien Enden der PCR-Amplifikate sauber von den in die PCR- Primer integrierten Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen geschnitten werden konnten, erfolgte eine Zwischenligation in den pGEM-T-Vector. Danach wurde das PCR-Produkt unter Anwendung der Restriktionsendonukleasen EcoRI und XhoI herausgeschnitten, eluiert, gereinigt und mit einem ebenfalls mit EcoRI und XhoI geschnittenem pGEX4T-1-Vector ligiert. Nach Transformation des hergestellten Konstruktes in Zellen

## Material und Methoden

---

der Bakterienstämme BL21 (DE3) pLysS und XL1-blue erfolgte die Analyse und Vermehrung von inserthaltigen Plasmiden. Zusätzlich wurde die Identität der inserierten DNA durch Sequenzierung überprüft.

### T1R2-pGEX4T-1

Bei diesem ebenso 600 bp großen N-terminalen Anteil der extrazellulären Domäne wurde analog der schon bei der Herstellung des T1R1-pGEX4T-1-Konstruktes beschriebenen Arbeitsschritte verfahren. Hierfür wurden die Oligonukleotidprimer T1R2-pGEX-A und T1R2-pGEX-B verwendet.

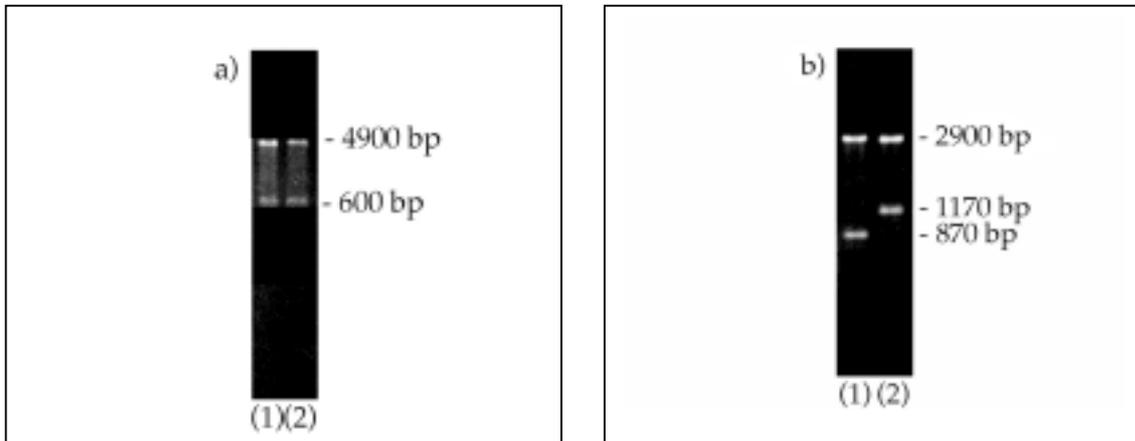
### T1R1-pRSET A

Dieses 870 bp große N-terminale Stück der extrazellulären Domäne wurde unter Anwendung der Primer T1R1-pRSET A-A und T1R1-pRSET A-B, sowie der Restriktionsendonukleasen NheI und EcoRI in den Expressionsvector pRSET A ligiert.

### T1R2-pRSET A

Dieses 1170 bp umfassende Fragment des extrazellulären Anteils des Geschmackrezeptors, welches zusätzlich noch die Sequenz der ersten transmembranären Sequenz beinhaltet, wurde mit Hilfe der Oligonukleotidprimer T1R2-pRSET A-A und T1R2-pRSET A-B, sowie ebenfalls mit den Restriktionsenzymen NheI und EcoRI, in den pRSET A-Vector kloniert.

Die Induktion dieser vier Konstrukte (siehe Abbildung 2.1) unter Anwendung von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid (IPTG) im Falle der in BL 21 (DE3) pLysS transformierten Sequenzen, sowie unter Anwendung von M13/T7-Phagen für Sequenzen, welche in XL1-blue-Zellen transformiert waren, erbrachte kein positives Ergebnis. Der ebenso versuchte Nachweis von spezifischen Proteinbanden -dies erfolgte jedoch nur bei den in pRSET A ligierten Sequenzen unter Anwendung von spezifischen Antikörpern gegen den Poly-His-Schwanz- blieb ebenfalls erfolglos. Hierzu wurden die Induktionsprodukte mittels der Western-Blot-Technik auf Nitrocellulose transferiert und unter unterschiedlichen Bedingungen, sowie Anwendung verschiedener Poly-His-Antikörpern ausgetestet.



**Abbildung 2.1**

1%-tiges Elektrophoresegel der für die Induktion hergestellten Konstrukte.

- a) Spur 1: T1R1 pGEX4T-1, T1R1 600 bp, Induktionsvector pGEX4T-1 4900bp  
Spur 2: T1R2-pGEX4T-1, T1R2 600 bp, Induktionsvector pGEX4T-1 4900 bp  
b) Spur 3: T1R1-pRSET A, T1R1 870 bp, pRSET A 2900 bp  
Spur 4: T1R2-pRSET A, T1R2 1170 bp, pRSET A 2900 bp

## 2.5 In-situ-Hybridisierung (ISH)

Bei der ISH bildet eine markierte Nukleinsäuresonde (sog. Antisense-Sonde) mit komplementärer mRNA im Gewebe Wasserstoffbrückenbindungen (Hybridisierung). Durch Detektion der markierten Sonde wird die dazu komplementäre RNA nachgewiesen. Zur Spezifitätskontrolle dient eine gleichermaßen markierte sog. Sense- Sonde, welche die gleiche Sequenz wie die nachzuweisende mRNA besitzt und somit nicht hybridisieren kann.

Es gibt cDNA-, cRNA- und Oligodesoxynukleotidsonden, mit denen man alle Arten von RNA nachweisen kann. In der vorliegenden Arbeit wird mit nicht-radioaktiven cRNA-Sonden gearbeitet.

### 2.5.1 In-vitro-Transkription zur Herstellung der cRNA-Sonden

Die Herstellung der Digoxigenin (DIG)-markierten cRNA-Sonden erfolgt unter Verwendung des DIG RNA Labeling Kits (Boehringer, Mannheim).

Als Ausgangsmaterial wird der pBluescript® II SK (+/-)-Vector benutzt, dessen Multiple

## Material und Methoden

---

cloning site (MCS) verschiedene cDNA-Insertionen aus dem zu untersuchenden Material enthält.

Nach einer Standard-PCR mit T3- und T7-Primern, erfolgt eine Ligation in den pGEM-T-Vector (2.4.6.2) mit anschließender Hitzeschock-Transformation (2.4.7.2) in kompetente E.coli JM 109. Daraufhin wird die mittels Plasmidpräparation (2.4.1.1) gewonnene DNA durch Restriktionsendonukleasen (2.4.4.1) linearisiert und mit PCI (2.4.2.2) extrahiert. Die gefällte Probe wird mit 80%-tigem EtOH gewaschen, das Pellet in 35 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Transkription und Markierung der Sonden.

Transkription- und Markierungsansatz (2 h bei 37°C):

10x DIG-RNA Labeling Mix	5 µl
Transkriptionspuffer	5 µl
(Sense- bzw.- Anti-sense-) DNA	35 µl
RNase- Inhibitor	0,5 µl
T3-RNA-Polymerase	5 µl
T7-RNA-Polymerase	5 µl

Nach kurzem Abzentrifugieren werden dem Ansatz 5 µl DNase/RNase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) für 30 min hinzugesetzt, um die Transkriptionsreaktion durch Entfernen des linearisierten Plasmides abzustoppen.

Es erfolgt nun mit dem Ansatz eine weitere PCI-Extraktion (2.4.2.2) mit anschließender EtOH-Fällung. Die Nukleotide werden für 1 h bei 45.000 rpm in einer Beckmann-T107 Ultrazentrifuge zentrifugiert und erneut gewaschen. Das resultierende Pellet wird in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O/0,5 µl RNase-Inhibitor gelöst. Die entstandenen cRNA-Fragmente werden in einem 0,8%-tigem Agarosegel analysiert und ihre Konzentrationen photometrisch ermittelt (2.4.3.1).

### 2.5.2 In-situ-Hybridisierung mit cRNA-Sonden

12 µm dicke Kryostatschnitte des zu untersuchenden Materials werden auf Superfrost

## Material und Methoden

---

Plus-Objektträger aufgezogen und anschließend für 5 min in frisch hergestellter 4%-tiger wässriger Formalinlösung fixiert. Hierauf werden die Schnitte aus dem Fixans in 100%-tiges EtOH transferiert und bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgt eine Rehydrierung mittels einer absteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 min in 95%-80%-tigem EtOH und für 2 min in 70%-tigem EtOH) mit Überführung in 2x SSC (je 10 min). Nun werden die Schnitte 15 min mit 1%-tigem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in MeOH behandelt, sowie zweimal gewaschen. Durch 0,2 M HCl für 8 min, erneutem Waschen, sowie 15-minütiger Behandlung mit 10 µg/ml Proteinase K gelöst in 10 mM Tris-HCl, mit folgendem Waschschriff, wird eine schwache Deproteinierung des Gewebes hervorgerufen. Unspezifische Bindungsstellen werden mit Acetylierungspuffer für 20 min blockiert. Nach erneutem Spülen für 2x 5 min in 2x SSC erfolgt die eigentliche Hybridisierung.

### Hybridisierung:

Die Gewebeschnitte werden mit 100 µl Hybridisierungspuffer bestückt und mit Parafilm (American National Can, Neenah, USA) überdeckt. Die cRNA-Sonde wird in einer Konzentration von 0,5-9 ng/µl Hybridisierungspuffer eingesetzt und bei 60°C über Nacht in einer feuchten Kammer (4x SSC) inkubiert.

### Posthybridisierung:

Das Entfernen unspezifisch gebundener cRNA- Sonden erfolgt durch folgende Waschschriffte:

30 min in 2x SSC, 30 min bei 60°C in 2x SSC/50% Formamid und 2x 10 min in 2x SSC. Anschließend werden die Schnitte für 30 min bei 58°C mit RNase-Puffer behandelt.

### Nachweis der DIG-markierten cRNA-Sonden:

Nach 5 min Äquilibrieren in DIG 1-Puffer werden unspezifische Bindungsstellen mit 0,5% Blockierungs-Puffer für 30 min abgesättigt. Anschließend erfolgt die Detektion der DIG-Moleküle durch Inkubation mit 1:100 anti-DIG-HRP (gelöst in 0,5% Blockierungs-Puffer) für 1 h, sowie einem 3x 5-minütigem Waschen mit TNT. Eine Verstärkung der Nachweisreaktion erfolgt durch eine 7 min Inkubation mit Biotin-Tyramide (gelöst in Amplification Diluent), nachdem die Schnitte zuvor mit 0,5% Blockierungs-Puffer in TNB-Puffer (FT-NEN-Kit; Boehringer, Mannheim) 30 min abgesättigt und mit TNT-Puffer gewaschen sind. Hierbei werden durch HRP neue Biotinmoleküle um das Enzym

## Material und Methoden

---

kovalent am Schnitt hergestellt. Hierauf folgen Waschschritte mit TNT und DIG 1-Puffer. Zuletzt erfolgt der Nachweis der am Schnitt gebundenen Biotin- Moleküle durch Inkubation mit Sa-AP 1:1000 in DIG 1-Puffer für 1 h mit anschließendem Waschen mit DIG 1- und DIG 3-Puffer. Die Entwicklung geschieht durch die Anwendung des AP-Nachweismediums.

Die Bildung von Reaktionsprodukten wird lichtmikroskopisch bestimmt und die Reaktion nach 12-48 h mit DIG 4-Puffer abgestoppt.

### Kontrolle:

Die Spezifität der Antisense-cRNA-Sonde wird durch ISH mit der entsprechenden Sense-cRNA-Sonde überprüft.

### Acetylierungspuffer:

0,1 M Trietholamin, pH 8,0; 0,25% Essigsäureanhydrid

### RNase-Puffer:

600 µl Tris-HCl, pH 7,5; 6 ml 5 M NaCl; 120 µl 0,5 M EDTA, ad 60 ml H<sub>2</sub>O

### DIG 1-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl

### Blockierungs-Puffer:

0,3g Blocking Reagenz; 30 ml DIG 1-Puffer; Spatelspitze BSA

### DIG 3-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl<sub>2</sub>

### AP-Nachweismedium:

DIG 3-Puffer mit 0,4 mM BCIP und 0,4 mM TNBT

## 2.6 Proteinchemische Methoden

### 2.6.1 Induktion von Fusionsprotein

#### 2.6.1.1 Induktion von BL 21 (DE3) pLysS-Zellen mit Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG)

Eine Übernachtskultur von BL 21 (DE3) pLysS-Zellen, welche die herzustellende Sequenz in einem Expressionsvector enthalten, werden mit LB-Medium (inklusive selektionierendem Antibiotikum) auf eine OD<sub>550</sub> von 0,3 (2.4.3.1) kultiviert. Zu dem entstehenden Ansatz wird IPTG zu einer finalen Konzentration (f.c.) von 1 mM gegeben.

Unmittelbar darauf werden 0,5 ml als 0 h-Induktionsprobe abgenommen und für ca. 40 sec abzentrifugiert, während der Restansatz für die Induktion bei 37°C auf dem Drehrad inkubiert wird. Der entstehende Überstand wird verworfen und das Pellet in 3x Laemmli-Probenpuffer (PP) resuspendiert. Anschließend wird die Probe mit dem Branson Sonifier (Danbury, USA) gut aufgeschlossen und für 5 min bei 95°C erhitzt. Daraufhin erfolgt die Proteinauftrennung durch eine SDS-PAGE (2.6.3). Mit den 2h-, 4h-, 6h-, 8h- und Übernacht-Induktionsproben wird auf gleiche Weise verfahren. Modifikationsmöglichkeiten bestehen im Rahmen der IPTG-Konzentration, der Induktionstemperatur sowie den Abnahmezeiten der Induktionsproben.

### Laemmli-Probenpuffer:

0,454 g Tris; 1,2 g SDS; 7,56 g Glycerol; 30 mg DTE; 400 µl Bromphenolblau (10 mg/ml);  
H<sub>2</sub>O ad 20 ml

## **2.6.1.2 Induktion von XL1-blue-Zellen mit M13/T7-Phagen**

### **2.6.1.2.1 Aufarbeiten der Phagen**

5 ml LB-Medium mit einer f.c. von 10 µg/ml an Tetrazyklin und XL1-blue MRF- Zellen werden über Nacht kultiviert und anschließend auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 mit LB-Medium (inkl. selektionierendem Antibiotikum) verdünnt. 100 ml LB-Medium werden sowohl mit 10 µl des OD<sub>600</sub>-Ansatzes der XL1-blue-Zellen, als auch mit 20 µl der M13/T7-Phagen versetzt und über Nacht inkubiert. Anschließend wird der Ansatz bei 7500 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der entstehende Überstand wird erneut abzentrifugiert, abgenommen und bei 70°C für 20 min inkubiert. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

### **2.6.1.2.2 Titerbestimmung der M13/T7-Phagen**

200 µl einer Übernachtkultur von XL1-blue MRF-Zellen (mit Tetrazyklin als selektionierendem Antibiotikum) werden in ein 15 ml-Greiner Röhrchen gegeben und mit 100 µl der aufgearbeiteten Phagen (2.6.1.2.1) vermengt. Um eine Verdünnungsreihe zu erstellen, werden 10 µl dieses Ansatzes mit 1 ml PBS gemischt. Dies entspricht einer Verdünnung von 10<sup>-2</sup>. Aus diesem Verdünnungsansatz werden nun 10 µl entnommen und mit 1 ml PBS versetzt (dies entspricht einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup>). Dementsprechend

## Material und Methoden

---

wird bis zu einer Verdünnung von  $10^{-14}$  verfahren. Die einzelnen Verdünnungsansätze werden für 5 min bei 37°C erhitzt. 3 ml einer auf 55°C erhitzten 0,7%-tigen Agar-Agar (Roth GmbH, Karlsruhe) Lösung werden zu den Verdünnungsansätzen gegeben und gut gemischt. Der Ansatz wird anschließend auf 37°C warme LB-Agar-Platten (ohne selektionierendes Antibiotikum) gegossen und durch leichtes Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Platten werden für 30 min stehen gelassen, mit einem Deckel verschlossen und mit diesem nach unten („upside down“) über Nacht inkubiert. Die entstehenden durchsichtigen Plaques können ausgezählt werden und so der Titer, also die Plaqueformig-units (pfu), des Phagenansatzes bestimmt werden.

### 2.6.1.2.3 Induktionsvorgang

Die Induktion erfolgt anfangs ebenso, wie unter 2.6.1.1 beschrieben, wobei die Zellen in Abänderung bis zu einer  $OD_{550}$  von 0,5 kultiviert werden. 1 h nach der Zugabe von IPTG werden pro Zelle (ca.  $5 \times 10^8$ ) 5-10 pfu (2.6.1.2.2) hinzugegeben und der 0 h-Wert abgenommen. Anschließend wird wie unter 2.6.1.1 beschrieben weiterverfahren.

### 2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine ihrem molekularen Gewicht nach auftrennen zu können, bedient man sich der Methode nach *Laemmli* (1970). Dies geschieht durch eine vertikale Gelelektrophorese in Polyacrylamidgelen, welche Natrium-Dodecylsulfat (SDS) enthalten. Für die verschiedenen Gellösungen wurden die Vorschriften von *Andersen* und *Petersen* (1981) eingehalten. Zunächst wird zwischen zwei Glasplatten, welche durch 0,75 mm oder 1 mm dicke Space voneinander getrennt sind, ein Trenngel mit Polyacrylamidanteilen von 10%, 12% oder 15% gegossen. Anschließend wird es mit  $H_2O$  überschichtet, um eine gleichmäßige Grenze zum späteren Sammelgel zu erhalten. Sammelgele, welche erst nach vollständigem Auspolymerisieren des Trenngeles (nach ca. 20 min) und Entfernen der überschichteten Flüssigkeit gegossen werden dürfen, besitzen einen Polyacrylamidgehalt von 5%. Nach dem Vermengen der Bakterienprobe mit dem Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 3:1, wird die Mischung für 5 min bei 96°C aufgeköcht. Auf ein quantitativ gleichmäßiges Auftragen in die Taschen des Sammelgeles ist zu achten. Die Elektrophorese in 1x Elektrophoresepuffer wird bei einer Spannung von 80 V im

## Material und Methoden

---

Sammelgel und 200 V im Trenngel durchgeführt. Anschließend wird das Gel entweder in einem Western-Blot (2.6.3) weiterverarbeitet oder für 30 min in Coomassie-Blau gefärbt. Das Auswaschen des Farbstoffes erfolgt über mehrere Stunden in Entfärbelösung.

### 5x Elektrophoresepuffer:

50 g SDS; 720 g Glycerol; 150 g Tris; H<sub>2</sub>O ad 10 l

### Coomassie-Blau:

2,5 g Serva Blau G250; 454 ml Isopropanol; 92 ml Eisessig; 454 ml H<sub>2</sub>O

### Entfärbelösung:

500 ml Eisessig; 750 ml Ethanol; H<sub>2</sub>O ad 10 l

### **2.6.3 Elektrotransfer von Proteinen aus SDS-Gelen (Western Blot)**

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-Polyacrylamidgel (2.6.2) werden die Proteine aus dem Gel in einem halbtrockenen („semi-dry“) Elektroblot-Verfahren nach *Kyhse-Anderson* (1984) auf eine Protein-absorbierende Nitrocellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher und Schuell, Darmstadt) transferiert. Dies erfolgt in einem „sandwich-ähnlichem“ System, bei dem Gel und Nitrocellulose zwischen puffergetränkten Filterpapieren (Anoden- und Kathodenpuffer) luftblasenfrei auf die Graphitelektroden der Laufkammer gelegt werden. Bei einer Stromstärke von 43 mA, dies entspricht 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> des SDS-Geles, erfolgt der Proteintransfer in 1,5 h. Um einzelne Laufspuren exakt identifizieren zu können, werden die Proteinbanden auf dem Nitrocellulosepapier nach dem Transfer für 2 min mit 0,5% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure gefärbt und anschließend mit PBS gewaschen.

### Aufbau eines Blot-„Sandwiches“ (von unten nach oben):

Graphitboden der Laufkammer

2 Filterpapiere getränkt in Anodenpuffer I

1 Filterpapier getränkt in Anodenpuffer II

Nitrocellulose

SDS-Polyacrylamidgel

3 Filterpapiere getränkt in Kathodenpuffer

Graphitdeckel der Laufkammer

## Material und Methoden

---

### Anodenpuffer I:

300 ml 1M Tris; 200 ml EtOH; 500 ml H<sub>2</sub>O

### Anodenpuffer II:

25 ml 1M Tris; 200 ml EtOH; 775 ml H<sub>2</sub>O

### Kathodenpuffer:

25 ml 1M Tris; 7,25 g Aminocaprinsäure; 200 ml EtOH; 775 ml H<sub>2</sub>O

### Ponceau S:

5 g Ponceau S; 30 g Trichloressigsäure; ad 1 l mit H<sub>2</sub>O

## 2.6.4 Nachweis spezifischer Proteinbanden

### 2.6.4.1 Nachweis von Proteinen mit Hilfe von Antikörpern gegen Tetra- bzw. Penta-Histidin

QIAexpress Detection (Qiagen, Hilden)

Das induzierte Material wird nach einer SDS-PAGE (2.6.2), sowie einem Western- Blot (2.6.3) zweimal mit TBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen werden durch die Inkubation mit 3% BSA gelöst in TBS für 1 h abgesättigt. Anschließend wird zweimal mit TBS-Tween/Triton-Puffer gewaschen, sowie 1x mit TBS. Anti-His- Antikörper, gelöst 1:1000 in 3% BSA in TBS, werden für 1 h inkubiert. Anschließend werden nicht-gebundene Antikörper mit TBS-Tween/Triton-Puffer, sowie TBS entfernt. Zum Nachweis des His-Tags wird nun der monoklonale anti-His-Antikörper durch den Zweitantikörper gam HRP pox (ein IgG der Ziege mit Meerrettichperoxidase, der gegen Maus gerichtet ist) 1:3000 in 3% BSA in TBS gelöst und für 1 h inkubiert. Durch 4-maliges Waschen mit TBS-Tween/Triton-Puffer werden nicht-gebundene Zweitantikörper entfernt. Anschließend wird die Nitrocellulose für 5-15 min mit HRP-Farbe-Lösung behandelt, die Reaktion mit einem wiederholten Spülen mit Wasser abgestoppt und unter Anwendung des Chemilumineszenzverfahrens durch ECL- Lösungen (Amersham, Braunschweig) entwickelt. Auf speziellen Röntgenfilmen (Hyperfilm™; Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Großbritannien), auf denen man die zu detektierenden Proteine als schwarze Banden identifizieren kann, wird das Ergebnis bildlich dokumentiert.

### 2.6.5 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Diese Methode ermöglicht es, bestimmte Antikörper aus dem Vollserum zu isolieren. So sollen Kreuzreaktionen des Antiserums mit anderen Proteinen bei immunocytochemischen Färbungen vermieden werden.

5 µg gekoppeltes und in PBS gelöstes Peptid wird hierzu auf Nitrocellulose getropft. Nachdem die Flüssigkeit angetrocknet ist, wird die Nitrocellulose mit Ponceau S getränkt und die gefärbten Nitrocelluloseabschnitte scharf ausgeschnitten. Die anschließende Entfärbung erfolgt durch mehrmaliges Waschen mit PBS. Unspezifische Bindungsstellen werden anschließend für 2 h mit 5% Magermilch in PBS abgesättigt. Nach einem dreimaligen Spülen mit PBS/0,05% Tween 20 wird das Kaninchenserum, das 1:50 in 5% Magermilch/PBS gelöst ist, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Nitrocellulosestücke erneut 3x mit PBS/Tween und anschließend 2x nur mit PBS gewaschen. Das Ablösen der Antikörper erfolgt mittels 400 µl 56°C warmen PBS für 10 min. Die affinitätsgereinigten Antikörper werden daraufhin mit 1% BSA-C (Aurion, Wageningen, Niederlande) in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß versetzt und bei 4°C gelagert.

### 2.6.6 Dot-Blot-Analyse

Ein einfaches Nachweisverfahren von Peptiden stellt die Dot-Blot-Analyse dar.

Dazu werden die zu untersuchenden Peptide, wie unter 2.6.5 beschrieben, auf Nitrocellulose aufgetragen. Nach kurzem Spülen, werden unspezifische Bindungsstellen durch 2-stündige Inkubation mit 5% Magermilch/PBS abgesättigt. Nach dem Waschen mit PBS/0,05% Tween wird das 1:1000 in Magermilch verdünnte Kaninchenserum, über Nacht bei 4°C und ständigem Drehen, inkubiert. Am Tag darauf wird -nach einem erneuten Spülschritt- der Zweitantikörper (Anti-Kaninchen IgG von Ziege 1:3000) für 2 h inkubiert. Es folgt ein weiteres Waschen und die ECL-Entwicklung (2.6.4.1).

## 2.7 Immunologische und immunhistochemische Methoden

### 2.7.1 Immunisierung von Kaninchen zur Herstellung von Antikörpern

#### 2.7.1.1 Kopplung von Peptiden an Trägermoleküle

Um synthetisch hergestellte Peptide für eine Immunisierung als Antigen zu verwenden, müssen sie, da sie auf Grund ihrer geringen Größe alleine nicht sehr immunogen sind, an größere Carrier gebunden oder absorbiert werden. Hierzu können u.a. Ni-NTA-Agarose, Ovalbumin oder Bentonite dienen.

##### 2.7.1.1.1 Kopplung an Ni-NTA-Agarose für s.c.-Immunisierung

Dieses Verfahren beruht auf den Erkenntnissen von *Sheibani* und *Frazier* (1998). Hierzu wird das gewünschte Peptid mit einem N-terminalen Abschnitt aus sechs Histidinen (6x His tag) synthetisiert (Peptidsynthese durch Prof. Palm, Physiologische Chemie II der Universität Würzburg), welcher eine hohe Bindungsaffinität an immobilisierte Nickel-Ionen zeigt.

Das Peptid wird in PBS so gelöst, dass eine Konzentration von 2 mg/ml entsteht (entspricht Peptidlösung A). 50-100 µl Ni-NTA-Agarose (Quiagen, Hilden) werden drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen und das Sediment in 0,4 ml PBS aufgenommen. Diese Menge wird zu 100 µl der Peptidlösung A hinzugefügt. Die hieraus entstehende 0,5 ml umfassende Peptidlösung B enthält ca. 200 µg Peptid.

##### 2.7.1.1.2 Kopplung an Ovalbumin für s.c.-Immunisierung

In einem Rundglas, das mit 4% Di-methyl-di-chlor-Silan gelöst in Tetrachlorkohlenstoff silianisiert ist, werden 2 mg Ovalbumin in 2 ml eiskaltem PBS gelöst. 3,3 mg des zu koppelnden Peptides, dies entspricht nach Abzug des Salzgehaltes ca. 2 mg Peptid, werden hinzugefügt. Nach tröpfchenweisem Versetzen des Ansatzes mit 2 ml GA-Lösung, wird dieser über 1 h lang bei 4°C verrührt. Zum Abstoppen werden je mg Peptid 10 mg Na-Bohrhydrid hinzugegeben und weitere 30 min verrührt. Über Nacht erfolgt anschließend eine Dialyse gegen PBS mittels eines EDTA-behandelten Dialyseschlauches.

### GA-Lösung:

160 µl GA (25%) (Roth, Karlsruhe); 1840 µl eiskaltes PBS

### **2.7.1.1.3 Adsorption von Peptiden an Bentonite für i.v.-Immunisierung**

100 mg Bentonite (Sigma, Steinheim) werden in 100 ml H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend für 10 min mit 2200 rpm in einer Beckmann-Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der abgenommene Überstand wird erneut für 10 min bei 3100 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des neu entstandenen Überstandes wird das Pellet in 200 µl resuspendiert und in 100 µl Aliquots bei -70°C gelagert.

Zum Weiterverarbeiten resuspendiert man ein Aliquot in 10 ml PBS und zentrifugiert den Ansatz für 10 min bei 3100 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 100 µl PBS gelöst. Hierzu wird nun die zu immunisierende Menge (hier 200 µg) an Peptid gegeben und gründlich gemischt.

### **2.7.1.2 Immunisierungsschema**

Vor der Erstimmunisierung muß ein Präimmunserum abgenommen werden und auf eventuelle Autoantikörper, die gegen die zu untersuchenden Strukturen gerichtet sind, hin untersucht werden. Es werden nun ca. 500 µg Peptid der Peptidlösung B (2.7.1.1.1) mit Polyalphaolefin-Mix (PAO) im Verhältnis 4:1 vermengt und diese Mischung dem Kaninchen subscapular injeziert. Nach drei Wochen erfolgt, wie im Immunisierungsschema von *Drenckhahn et al.* (1993) beschrieben, eine Nachimmunisierung (Boost) mit derselben Menge Peptid. 10 Tage darauf wird das erste venöse Blut an der dorsalen Ohrvene abgenommen und auf Spezifität, mittels Immunfluoreszens (2.7.5) oder Dot-Blot-Analyse (2.6.6) untersucht. Drei Wochen nach der ersten Nachimmunisierung erfolgt eine zweite Boosterung, mit einer sich zehn Tage danach anschließenden Blutuntersuchung. Nach einigen Zyklen bzw. einem nicht zufriedenstellenden Ergebnis wird mit einer i.v.-Immunisierung begonnen. Hierfür werden 200 µg des an Bentonite adsorbierten Peptides (2.7.1.1.2) ohne Zusatz von Freudschen Adjuvans an fünf aufeinander folgenden Tage i.v. in eine der dorsalen Ohrvenen injeziert. Vier bis zehn Tage nach der letzten i.v.-Immunisierung wird wiederum Blut abgenommen und ausgetestet. Zwei Wochen nach der ersten i.v.-Serie kann sich eine ebenso durchgeführte zweite Immuni-

sierungsserie anschließen.

Das zu testende Serum erhält man durch Abzentrifugieren des entnommenen und geronnenen Blutes. Um das Serum vor Verunreinigung zu schützen (v.a. Pilzbefall) werden je 200 µl Serum 1 µl 0,1 mM NaN<sub>3</sub> hinzugefügt und bei 4°C gelagert .

### PAO-Mix:

4 ml PAO; 0,9 ml Tween 81; 0,3 ml Tween 80

### **2.7.2 Antigenkompetition**

Zum Nachweis der Spezifität des Immunsersums wird eine Antigenkompetition durchgeführt. Antigen und Immunsersum werden dabei so gemischt, dass das in PBS gelöste Antigen im Vergleich zur Antikörper-Konzentration im Überschuß vorliegt (dies entspricht in der vorliegenden Arbeit: 20 µl der Peptidlösung A mit einer Konzentration von 2 mg/ml (2.7.1.1.1) werden in 50 µl PBS gelöst; hierzu wird 1 µl des zu inhibierenden Antikörpers gegeben). Der Ansatz reagiert nun für mehrere Stunden bei RT und nach Abzentrifugieren von Antigen-Antikörper-Präzipitaten wird der Überstand für die Immunfluoreszenzinkubation (2.7.5) verwendet.

### **2.7.3 Semidünnschnittpräparate**

Nach der Gewebereinbettung in Epoxidharz und Herstellung von Semidünnschnitten auf Deckgläsern, wie bei *Drenckhahn* und *Wagner* (1986) beschrieben, wird das Epoxidharz für 6 min mit Natriummethanolat aus dem Gewebe herausgelöst. In einem 1:1 Gemisch an Methanol-Toluol wird 5 min lang das Natriummethanolat entfernt. Hierauf folgen zwei Waschstschritte für je 5 min mit Aceton und ein weiterer ebenso langer mit H<sub>2</sub>O. Das abschließende Äquilibrieren erfolgt für 5 min in PBS. Hieran schließt sich die Inkubation an.

### Natriummethanolat:

10% Natrium-Methoxid in Methanol-Toluol

### **2.7.4 Kryostatschnitte**

Für die Immunfluoreszenz werden ca. 8 µm dicke Kryoschnitte hergestellt und durch Hitze auf einem Objektträger fixiert. Vor der Inkubation (2.7.5) werden die Schnitte für 30 min mit BSA-C abgesättigt.

### 2.7.5 Immunfluoreszenzinkubation

Das Vollserum des Primärantikörpers (2.7.1.2) wird in PBS-Verdünnungen 1:70-1:100 verwendet, das affinitätsgereinigte Serum (2.6.5), sowie das Serum aus der Antigenkompetition (2.7.2), werden unverdünnt eingesetzt. Es werden jeweils 20 µl Antiserum pro Schnitt aufgetragen. Die Inkubation erfolgt über zwei Nächte bei 4°C in einer feuchten Kammer. Danach werden die Schnitte 3x 5 min mit PBS gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit abgewischt. Anschließend werden 20 µl des mit PBS 1:600 verdünnten Sekundärantikörpers (Ziege-anti-Kaninchen-IgG) aufgetropft und bei RT für 30 min inkubiert. Hierauf folgt ein erneutes Waschen mit PBS, wie oben beschrieben. Nun erfolgt die Einbettung der Schnitte in Glycerol-PBS dem 1,5% n-Propylgallat hinzugefügt wird, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

#### 1,5% n-Propylgallat:

4 ml PBS; 6 ml Glycerol; 0,15 g n-Propylgallat

### 2.7.6 Enzym-gekoppelter Immunadsorptions Test (ELISA)

Der ELISA (engl.: enzyme linked immuno sorbant assay) dient zum quantitativen Nachweis von Antikörpern des Kaninchenserums (2.7.1.2).

100 µl des in Kopplungs-Puffer gelösten Antigenes (f.c. 10 µg/ml) werden in die gewünschte Anzahl von Vertiefungen (well), der mit Polystyrol beschichteten Mikrotiterplatten (F-96, Nunc, Wiesbaden), pipettiert, bei der als Negativ-Probe die letzte Vertiefung einer jeden Reihe mit 0,3 µg in Beschichtungs-Puffer gelöstem BSA beladen wird. Als Positiv-Probe dient in der vorliegenden Arbeit aus Hühnerdarm gereinigtes Villin. Die Platte wird daraufhin bei 4°C über Nacht inkubiert. Durch einfaches Ausschlagen wird die Lösung am darauffolgenden Tag entfernt und 3x 5 min mit 200 µl TBST/well gewaschen. Zur Absättigung freier Bindungsstellen werden 200 µl einer 1%-igen Fisch-Gelatinelösung für 2 h in jeder Vertiefung belassen. Danach schließt sich, wie nach jedem weiteren Arbeitsschritt, ein Spülschritt an (4x 5 min 200 µl TBST/well). Der im Blockierungs-Puffer gelöste Erstantikörper des zu testenden Kaninchenserums wird in einer Verdünnungsreihe (1:50, 1:100, 1:200,...) aufgetragen und für 2 h inkubiert. Durch Spülen wird dieser Primärantikörper entfernt und der Zweitantikörper (IgG Ziegenantikörper, der gegen Kaninchen gerichtet ist und mit einer Meer-

## Material und Methoden

---

rettich-Peroxidase markiert ist) für 1 h in einer Verdünnung von 1:3000 inkubiert. Durch ein Nachwaschen mit TBST werden ungebundene Antikörper gewaschen. Anschließend erfolgt die Entwicklung des ELISA unter Anwendung der 1-Step<sup>TM</sup>-Turbo TMB-ELISA-Lösung (Firma Pierce, Rockford, USA), sowie die photometrische Auswertung (Titertek Multiskan<sup>®</sup> Plus; Labsystems, Finnland).

### Coating-Puffer:

17 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 8 ml 0,2 M NaHCO<sub>3</sub>; ad 1000 ml H<sub>2</sub>O; pH 10,6 einstellen

### Blockierungs-Puffer:

1% Gelatine in 150 mM NaCl und 20 mM Tris, pH 7,4

### Tris-BS-Tween 0,05% (TBST):

10 mM Tris; 50 ml NaCl; 0,05% Tween; ad 1000 ml H<sub>2</sub>O; pH 7,2 einstellen

## 3 Ergebnisse

### 3.1 In-situ-Hybridisierung (ISH)

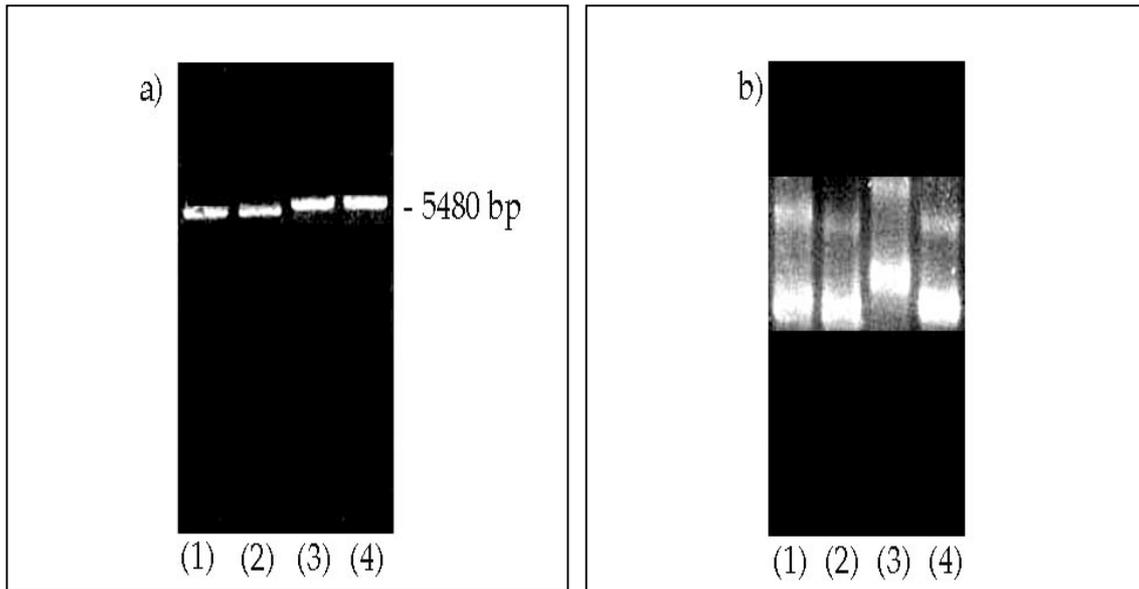
Mit Hilfe der ISH wurde die kodierende mRNA für die einzelnen Rezeptoren T1R1 und T1R2 auf zellulärer Ebene im Bereich der Geschmacksknospen der Rattenzunge nachgewiesen. Hierzu wurde eine nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH) mit Digoxigenin-markierter cRNA mit anschließender BT-Verstärkung an Papillae circumvallatae sowie an Papillae foliatae der Rattenzunge durchgeführt.

#### 3.1.1 Herstellung der Antisense- und Sense-Sonden

Sowohl die zu hybridisierende Sonde (sog. Antisense-Sonde), wie auch die nicht hybridisierende Sonde (sog. Sense-Sonde) umfaßten die gesamte bekannte Sequenz der beiden zu untersuchenden Rezeptoren. Dies entsprach im Falle des T1R1 2533 bp und bei T1R2 2529 bp.

Zuerst wurden die in pBluescript II SK inserierten Sequenzen mittels T3- und T7- Primern in einer Standard-PCR amplifiziert und in kompetente E. coli JM 109 transformiert. Nach einer Maxi-Präparation der gewachsenen Zellen wurden unter Anwendung der Restriktionsendonukleasen KpnI (für die T1R1-DNA) und EcoRI (für die T1R2-DNA) die Plasmide linearisiert und in einem Agarosegel analysiert (siehe Abbildung 3.1a). Es wurde dabei darauf geachtet, dass die verwendeten Enzyme nur in den Multiple Cloning Site (MCS) der entsprechenden Vektoren eine Schnittstelle herstellten, nicht jedoch in den T1R1- und T1R2-Sequenzen, was eine teilweise Zerstörung der hieraus entstehenden Sonden zur Folge gehabt hätte. Die linearisierten DNA-Stücke wurden anschließend mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) extrahiert, gefällt und mit Ethanol gewaschen. Hieran schloß sich die in-vitro-Transkription und Markierung der T1R1- und T1R2-DNA mit Digoxigenin (2.5.2) an. Nach einer erneuten PCI-Extraktion, sowie einer sich anschließenden Fällung wurden die entstandenen Digoxigenin markierten cRNA-Sonden in einem Agarosegel analysiert (siehe Abbildung 3.1b).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.1**

a) 1%-tiges Elektrophoresegel nach Linearisierung der in pBluescript inserierten T1R1- und T1R2- Sequenzen

Spur 1: Sense-T1R1; Spur 2: Anti-Sense-T1R1; Spur 3: Sense-T1R2; Spur 4: Anti-Sense-T1R2

b) 1%-tiges Elektrophoresegel nach Transkription und Markierung der cRNA-Sonden mit Digoxigenin; es ist darauf zu achten, dass dies nur ein Gel zur Analyse war, ob eventuelle noch vorhandene RNAsen die produzierten cRNA-Sonden zerstört haben; genaue Größenangaben über die Sonden konnten aus diesem Gel nicht abgelesen werden; oberhalb der durch die Sonden entstandenen Banden, laufen für RNA-Gele charakteristische Zusatzbanden

Spur 1: Sense-T1R1; Spur 2: Anti-Sense-T1R1; Spur 3: Sense-T1R2; Spur 4: Anti-Sense-T1R2

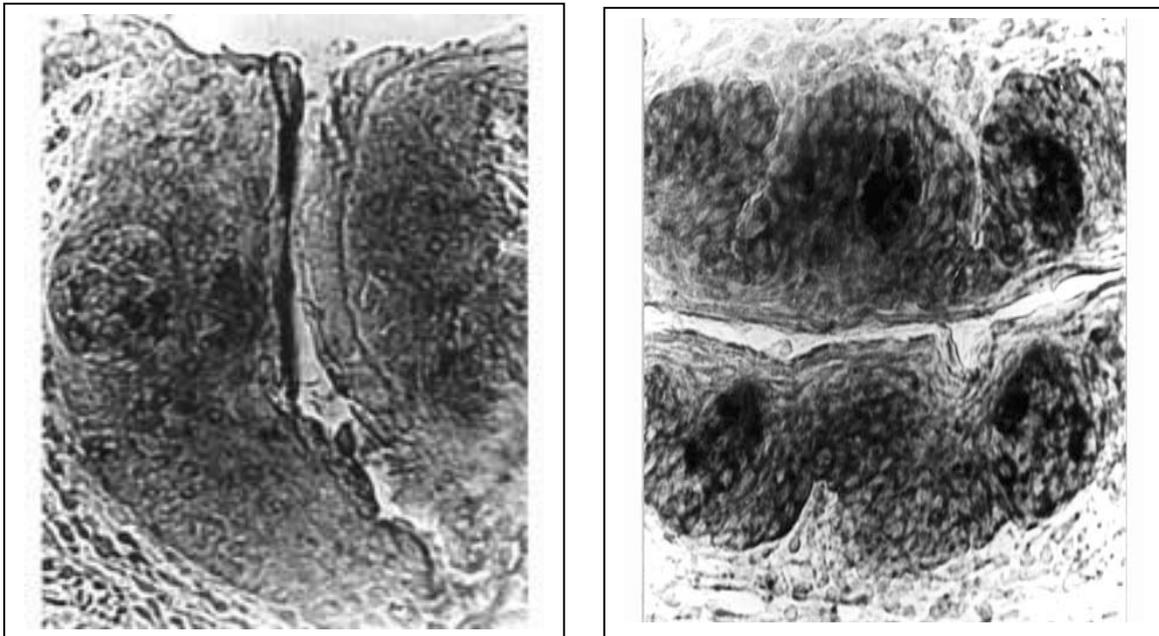
### 3.1.2 Anwendung der hergestellten Sonden an Zungengewebe der Ratte

Bei der ISH mit Hilfe der Antisense-Sonde (siehe Abbildung 3.2) von T1R1 zeigte sich an der Rattenzunge, wenn auch nicht in jeder Geschmacksknospe der untersuchten Papillae foliatae, eine gut erkennbare Reaktion. Deutlich stärker und in der Häufigkeit öfter vorhanden war jedoch die Reaktion der T1R2 Antisense-Sonde an Gewebe der Geschmacksknospen von Papillae circumvallatae. Exakte Verteilungsmuster und Verteilungshäufigkeiten wurden für beide Rezeptoren nicht eingehender untersucht.

Als Spezifitätskontrollen wurden bei der cRNA-ISH die Sense- anstatt der Antisense-Sonde eingesetzt. Beide Kontrollen führten wie erwartet zu keiner Färbereaktion (siehe Abbildung 3.3).

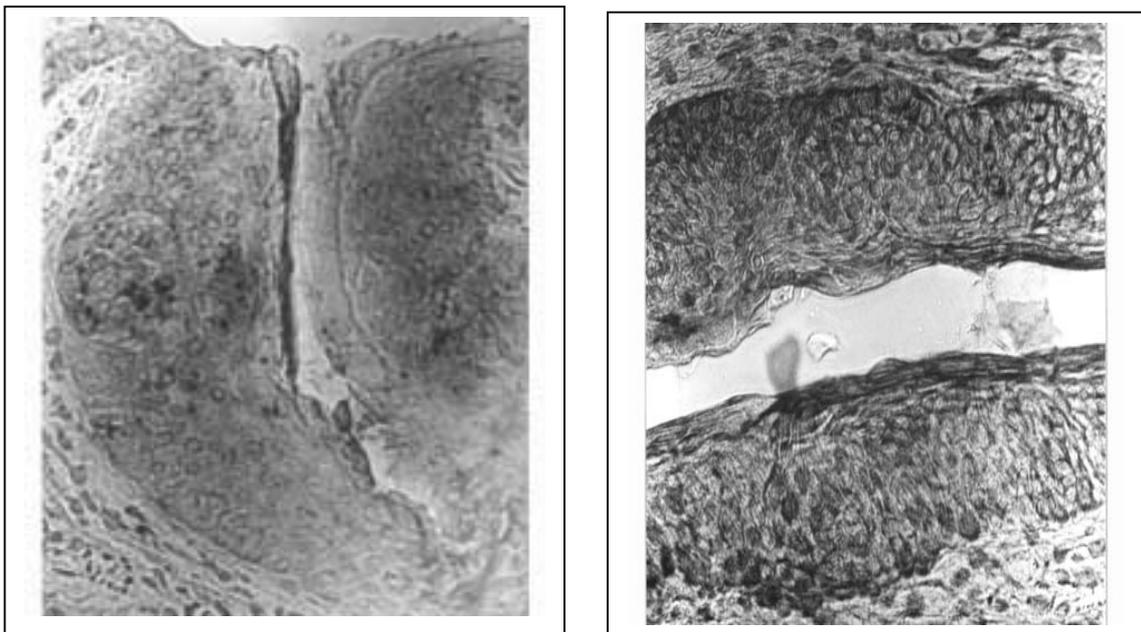
## Ergebnisse

---



**Abbildung 3.2**

In-situ-Hybridisierung unter Anwendung der Antisense-Sonde von T1R1 (links) und T1R2 (rechts) an Gewebe der Papillae foliatae (für T1R1) und der Papillae circumvallatae (für T1R2) der Ratte.



**Abbildung 3.3**

In-situ-Hybridisierung unter Anwendung der Sense-Sonde von T1R1 (links) und T1R2 (rechts) an Gewebe der Papillae foliatae (für T1R1) und der Papillae circumvallatae (für T1R2) der Ratte.

Weitere Untersuchungen unter Anwendung der T1R1- und T1R2-Antisense-Sonden an Gewebestücken anderer verschiedener Geschmackspapillen wurden nicht durchgeführt.

In-situ-Hybridisierungen an Geweben der Cardia des Magens, dem Duodenum, den Pancreasgängen, sowie an Lunge, Herz, Retina, Leber und Niere von Ratten erbrachten keine weiteren positiven Ergebnisse.

## 3.2 Antikörperherstellung

### 3.2.1 Antikörperherstellung gegen Peptide als Antigen

#### 3.2.1.1 Auswahl der Peptide und Immunisierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Peptidsequenzen für T1R1 und T1R2 jeweils aus einem, dem N-terminalen nahen, Abschnitt der extrazellulären Domänen der zu untersuchenden Rezeptoren gewählt. Bei T1R1 entsprach dies den AS 50-71 und bei T1R2 den AS 48-65. Die Auswahl dieser Sequenzen orientierte sich zum einen an der Spezifität für den jeweiligen Rezeptor, zum anderen an ihren guten antigenen Eigenschaften. Diese zeigte sich unter Zuhilfenahme eines computergestützten Hydrophobizitäts-Plots, nach der *Kyte* und *Doolittle* (1982)-Analyse. An ihr N-terminales Ende wurde der für die nicht-kovalente Bindung mit Ni-NTA-Agarose, welche als Trägerstoff für die Immunisierung dienen sollte, benötigte Taq (Schwanz) aus sechs Histidinen synthetisiert.

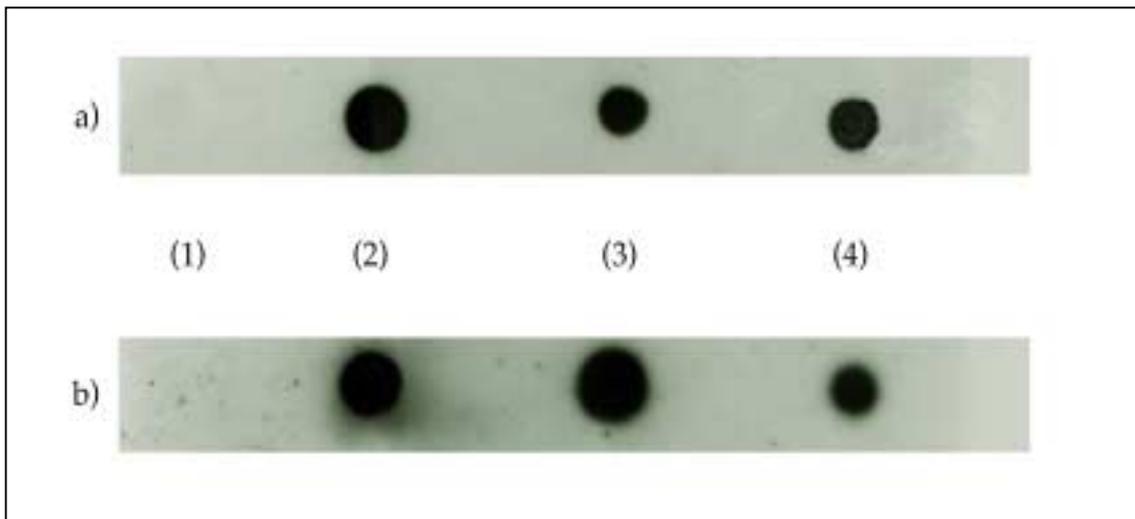
Die Immunisierung wurde an insgesamt sechs Kaninchen (jeweils drei für T1R1 und drei für T1R2), deren Präimmunseren in Vorversuchen an Kryostat- und Semidünnschnittpräparaten im Bereich der Geschmackspore von Geschmacksknospen der Rattenzunge negative Ergebnisse zeigten, durchgeführt. So konnte ausgeschlossen werden, dass unspezifische (Auto-) Antikörper ein falsches positives Ergebnis vortäuschten. Es konnten jedoch zahlreiche unspezifische Färbungen in anderen Abschnitten der Geschmacksknospen beobachtet werden.

Das Immunisierungsschema bestand aus einer Grundimmunisierung, sowie zwei Nachimmunisierungen. Diese wurden allesamt mit Ni-NTA-gekoppelten Peptiden durchgeführt. Die dritte Nachimmunisierung erfolgte mit an Ovalalbumin gekoppeltem Peptid und die sich daran anschließenden i.v.-Immunisierungen mit an Bentonite adsorbierten

Peptiden.

### 3.2.1.2 Testen des gewonnenen Kaninchensерums

Das nach jeder Immunisierung gewonnene Serum wurde zunächst mit der Dot-Blot-Analyse auf einen erkennbaren Antikörpertiter hin untersucht (siehe Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4**

Dot-Blot-Analyse des gewonnenen Kaninchensерums (oben: T1R1, unten: T1R2)

- a) (1) Negativkontrolle BSA, (2) T1R1-Peptid gekoppelt an Ovalbumin, (3) Ovalbumin, (4) T1R1-Peptid  
b) (1) Negativkontrolle BSA, (2) T1R2-Peptid gekoppelt an Ovalbumin, (3) Ovalbumin, (4) T1R2-Peptid

Ein positives Ergebnis ergab sich für das T1R2-Peptid nach der ersten und für das T1R1-Peptid nach der zweiten i.v.-Immunisierung, da das jeweilige Serum mit dem vorgelegten Peptid, nicht jedoch mit einer aufgetragenen Negativprobe (hier: bovines Serumalbumin, BSA), eine deutliche Reaktion zeigte. Eine Reaktion mit dem Trägerstoff Ovalbumin konnte dabei nicht verhindert werden. Trotzdem konnte nicht an einem positiven Titer gezweifelt werden, da auch die Reaktion gegen das aufgetragene reine Peptid und nicht nur gegen das gekoppelte Peptid positiv war.

Hierauf wurde das Kaninchensерum mit der Durchführung des Immunoassays (ELISA) eingehender auf seine Spezifität hin untersucht. Auch hierbei bestätigten sich die bisher gewonnenen Erkenntnisse. Als Negativkontrolle, die ebenfalls den Erwartungen entsprach, diente für das Serum gegen das T1R1-Peptid das T1R2-Peptid und umgekehrt.

### 3.2.1.3 Immunfluoreszenz unter Anwendung des Vollserums

Die gewonnenen Peptid-Antikörper-Seren reagierten ausnahmslos nicht in Semidünnschnittpräparaten, was weitere Untersuchungen sehr erleichtert hätte. Sämtliche Immunfluoreszenzuntersuchungen sowohl von T1R1 als auch T1R2 wurden an Papillae circumvallatae von Rattenzungen durchgeführt, um einen besseren Vergleich zwischen den einzelnen gefärbten Präparaten zu erhalten.

In Kryostatserienschnittpräparaten von Papillae circumvallatae der Rattenzunge reagierten die positiv getesteten nativen Seren (siehe Abbildung 3.5), mit den Mikrovilli der Geschmacksknospen im Bereich der Geschmackspore. Um eventuell vergleichende Aussagen treffen zu können, wurden hier sowohl die T1R1, als auch die T1R2, zuerst nur an Geweben der Papillae circumvallatae getestet. Andere Zellbestandteile sowohl der Geschmacksknospen, wie auch andere Abschnitte des Zungengewebes, sowie die parallel dazu aufgetragenen Präimmunsereen zeigten keine spezifische Reaktion. Um sicher zu gehen, dass es sich bei der Färbung im Bereich der Geschmackspore um Mikrovilli handelte, wurde in Parallelschnitten eine Kontrolle mit einem Antikörper gegen Villin durchgeführt (siehe Abbildung 3.9). Villin ist spezifisch in den Mikrovilli im apikalen Bereich einer jeden Geschmacksknospe konzentriert und eignet sich so hervorragend als Markermolekül für diese Mikrovilli (*Höfer und Drenckhahn, 1999*).

Auffällig war, dass nicht ausnahmslos alle Knospen im Bereich der Geschmacksporen eine Immunreaktivität mit den T1R-Antiseren zeigten. Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit T1R-Antikörpern erzielt werden, die uns die Arbeitsgruppe um *Hoon et al.* (1999) zur Verfügung stellte (siehe Abbildung 3.7).

### 3.2.1.4 Immunfluoreszenz mit affinitätsgereinigten Antikörpern

Um die zum Teil noch sehr schwachen Immunfärbungen im Bereich der Geschmackspore zu verstärken, sowie um mögliche begleitende unspezifische Antikörper aus dem nativen Kaninchenserum zu entfernen und somit zu einer spezifischeren Färbung zu gelangen, wurden affinitätsgereinigte Antikörper aus den positiv getesteten Seren hergestellt. Auch diese gereinigten Seren reagierten ausschließlich an Kryostatschnittpräparaten und wurden an Gewebeproben von Papillae circumvallatae durchgeführt. Auch hier wurden zur Kontrolle parallel Inkubationen mit den Präimmun-

seren der Voruntersuchungen, sowie mit Antikörpern gegen Villin vollzogen.

Es zeigten sich eine deutliche Immunmarkierung im Bereich der apikalen Regionen einiger Geschmacksporen (siehe Abbildung 3.6). Wie schon bei den Untersuchungen des nativen Serums gezeigt wurde, färbten die affinitätsgereinigten Antikörper nicht jede Geschmacksknospe im Porenbereich an. Die in Abbildung 3.6a sichtbare Anfärbung zellulärer Strukturen ließ sich trotz der Affinitätsreinigung nicht komplett unterdrücken.

### 3.2.2 Inhibitionsversuche

Die Spezifität der Immunfluoreszenz ließ sich durch einen Inhibitionsversuch nachweisen. Hierzu wurden die affinitätsgereinigten Seren vor der Inkubation mit einem Überschuß des antigenen Peptides inhibiert. Auch diese Versuche wurden für vergleichende Aussagen an den Papillae circumvallatae von Rattenzungen durchgeführt.

Wie es zu erwarten war, zeigten sich im Bereich der Geschmacksporen keinerlei spezifische Färbungen, da ein Großteil der spezifischen Antikörper durch das vorgelegte Peptid inhibiert wurde. Lediglich einige Zellstrukturen unterhalb der Geschmackspore, sowie andere Zellbestandteile wurden unspezifisch angefärbt (siehe Abbildung 3.8).

Wurde jedoch mit dem nicht-äquivalenten Peptid inhibiert (T1R1-Antikörper mit T1R2-Peptid und umgekehrt) wurde erwartungsgemäß keine Inhibition festgestellt und es zeigten sich wieder deutliche Färbungen im Bereich der Geschmacksporen einiger Geschmacksknospen (ohne Abbildung).

Sowohl die positiven nativen Kaninchenserum, wie auch die affinitätsgereinigten Antikörper wurden nicht an weiteren Geschmackspapillen der Rattenzunge ausgetestet.

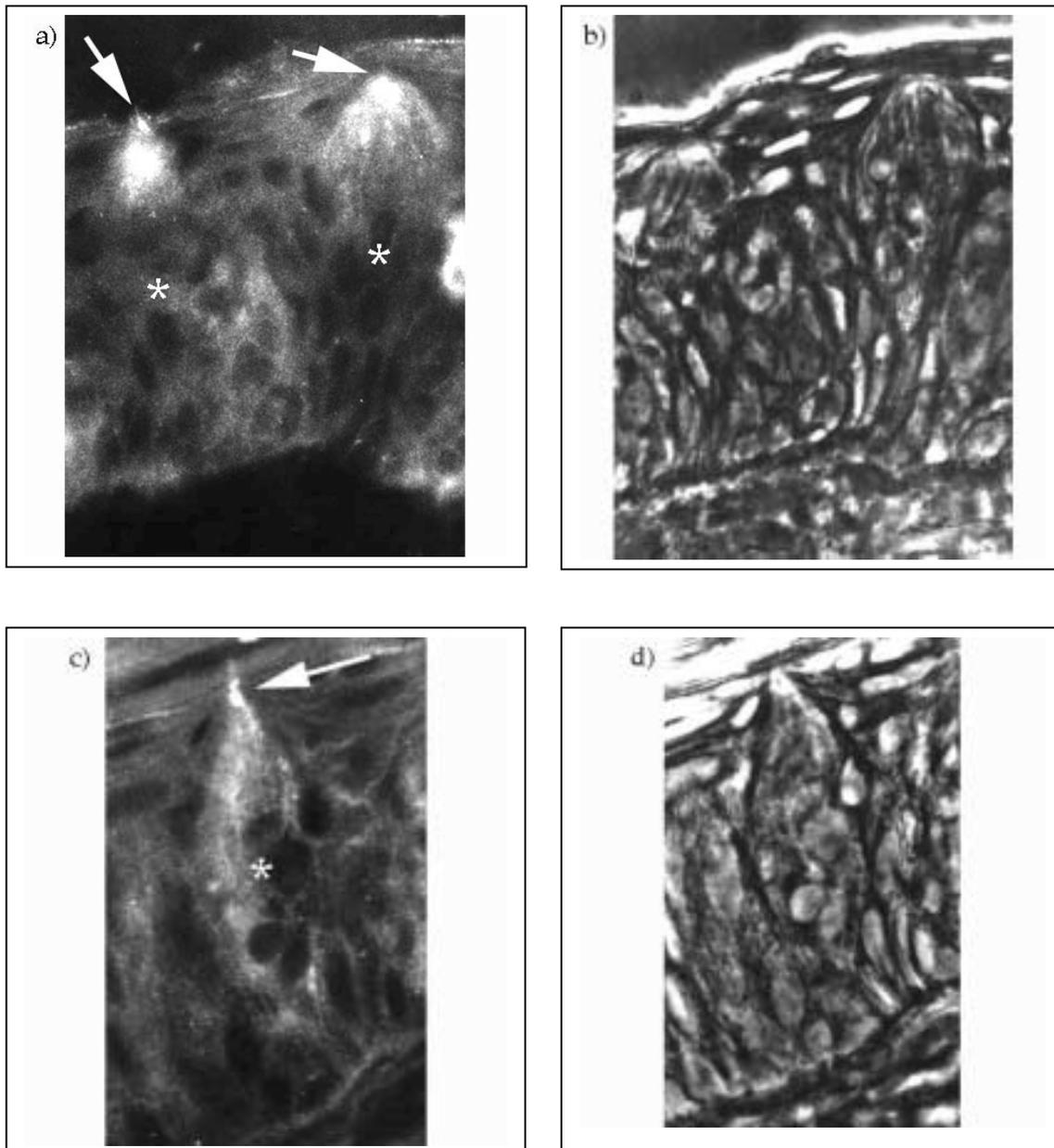
Dagegen wurden mit diesen gewonnenen Materialien eingehende Untersuchungen an extralingualen Geweben durchgeführt. Das Hauptaugenmerk richtete sich hierbei auf Gewebeproben des Gastrointestinaltraktes, wie der Cardia des Magens, des Duodenums und des Pancreas der Ratte, die besonders viele Gustducin-positive Bürstenzellen enthalten. Zahlreiche Inkubationen mit unterschiedlichen Umgebungskonditionen, wie auch verschiedene Verdünnungen erbrachten, wie auch schon bei den ISH, keine spezifischen Färbungen. Somit boten auch sie keinen Hinweis auf das Auftreten der Rezeptoren T1R1 und T1R2 in diesen Geweben.

## Ergebnisse

---

Ähnlich umfangreich durchgeführte Versuche an Geweben der Lunge, des Herzens, der Retina, der Leber, sowie der Niere der Ratte führten ebenfalls nicht zu positiven und spezifischen Anfärbungen. Hodengewebe wurde nicht untersucht.

## Ergebnisse



### **Abbildung 3.5**

Immunfluoreszenz mit nativen Kaninchenserum an Kryostatquerschnitten von Papillae circumvallatae der Ratte; Pfeile zeigen auf die immunreaktive Mikrovillusregion der Geschmacksknospe (Sternchen)

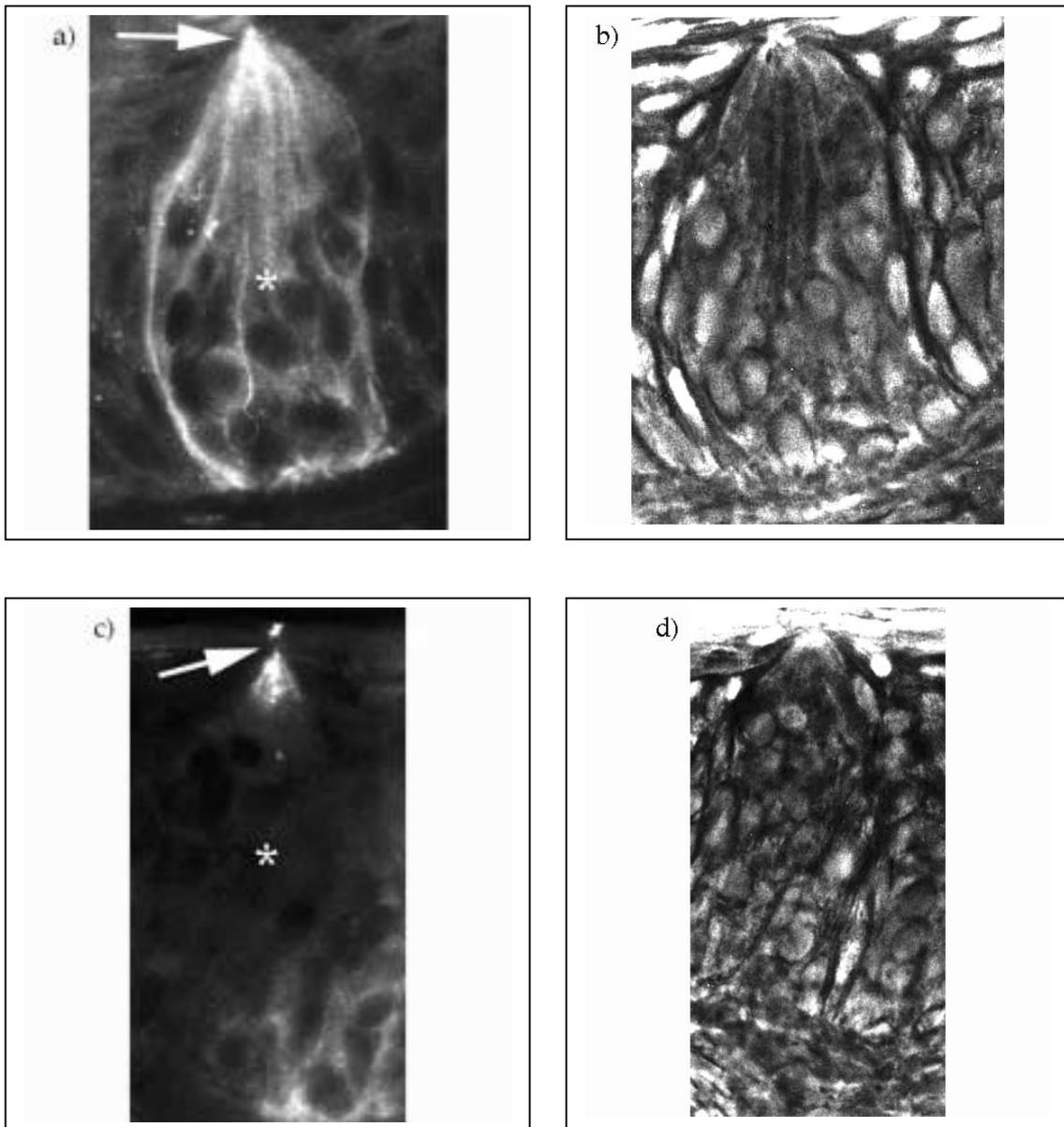
a) natives T1R1-Serum 1:50

b) korrespondierendes Phasenkontrastbild

c) natives T1R2-Serum 1:70

d) korrespondierendes Phasenkontrastbild

## Ergebnisse

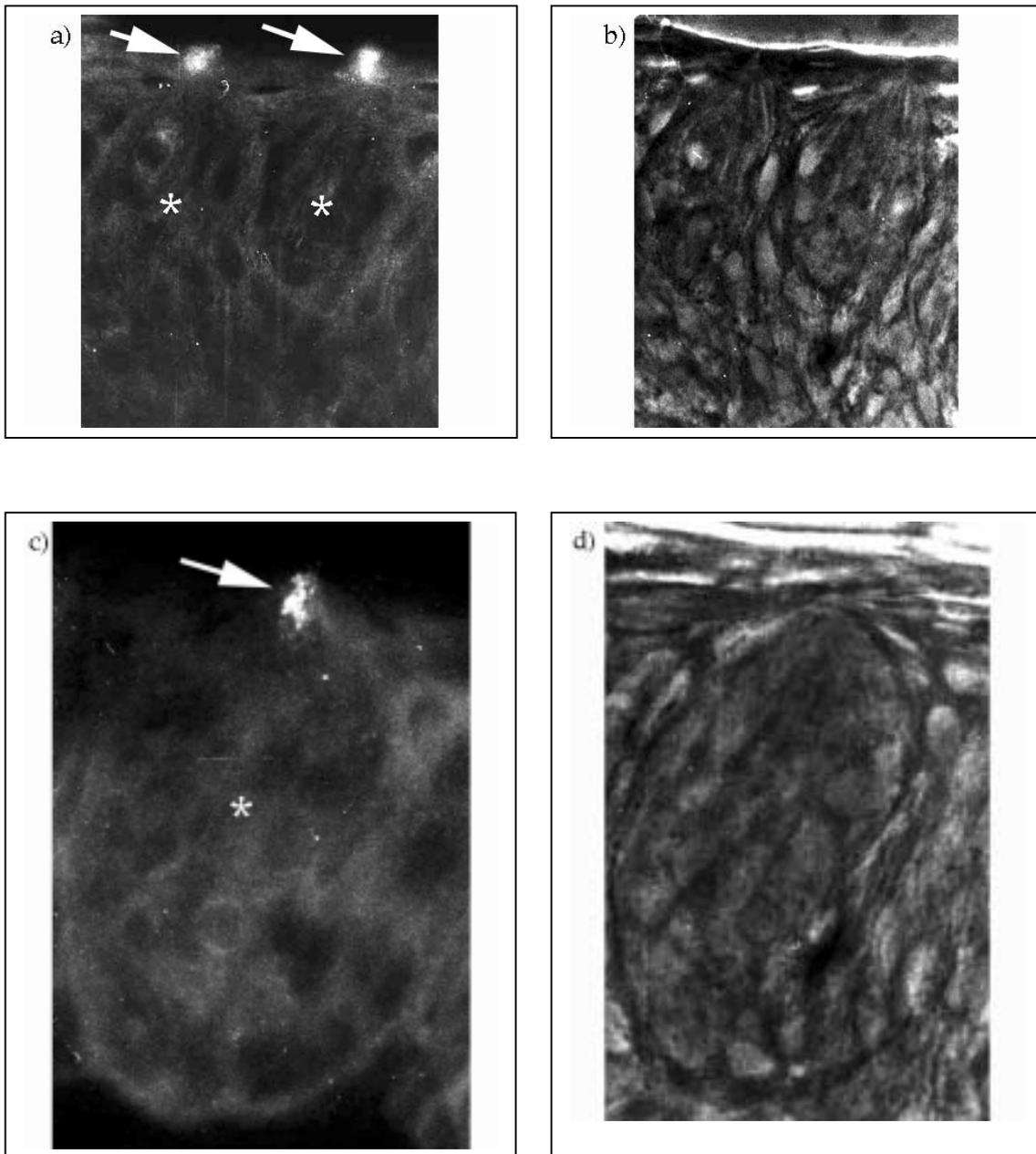


**Abbildung 3.6**

Immunfluoreszenz mit affinitätsgereinigten Immunglobulinen an Kryostatschnitten von Papillae circumvallatae der Ratte; Pfeile zeigen auf die immunreaktive Mikrovillusregion der Geschmacksknospe (Sternchen)

- a) affinitätsgereinigtes T1R1-Serum
- b) korrespondierendes Phasenkontrastbild
- c) affinitätsgereinigtes T1R2-Serum
- d) korrespondierendes Phasenkontrastbild

## Ergebnisse



**Abbildung 3.7**

Immunfluoreszenz mit T1R-Antikörpern der Arbeitsgruppe von Hoon (*Hoon et al., 1999*) an Kryostatschnitten von Papillae circumvallatae der Ratte; Pfeile zeigen auf die immunreaktive Mikrovillusregion der Geschmacksknospe (Sternchen)

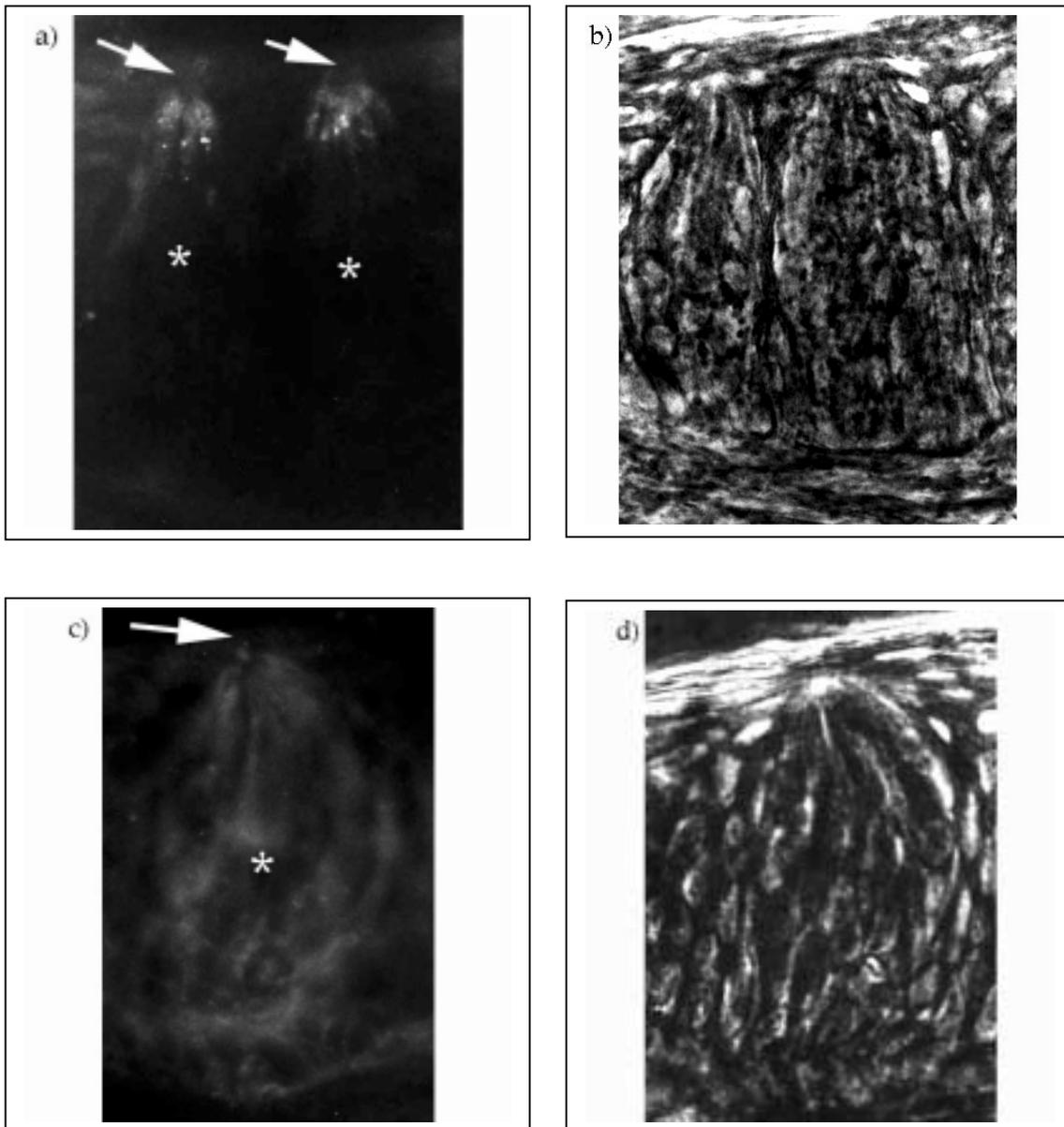
a) T1R1-Serum 1:70

b) korrespondierendes Phasenkontrastbild

c) T1R2-Serum 1:70

d) korrespondierendes Phasenkontrastbild

## Ergebnisse

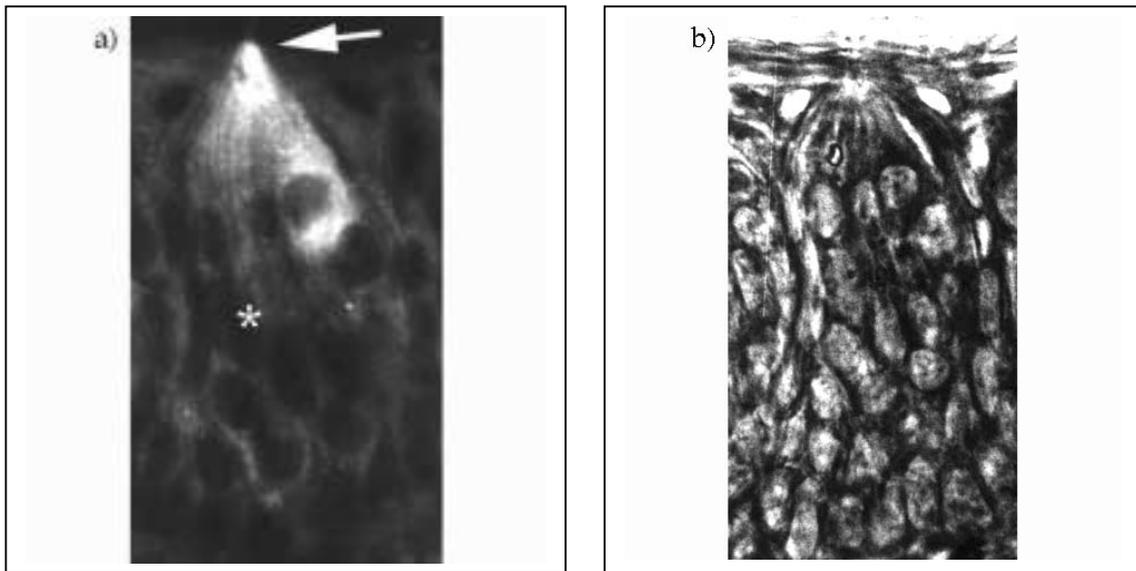


### **Abbildung 3.8**

Inhibition des affinitätsgereinigten Kaninchensersums mit dem jeweils entsprechenden Antigen-Peptid an Kryostatschnitten von Papillae circumvallatae der Ratte; Pfeile zeigen auf die jetzt nicht immunreaktive Mikrovillusregion der Geschmacksknospe (Sternchen)

- a) mit T1R1-Peptid inhibiertes affinitätsgereinigtes T1R1-Serum
- b) korrespondierendes Phasenkontrastbild
- c) mit T1R2-Peptid inhibiertes affinitätsgereinigtes T1R2-Serum
- d) korrespondierendes Phasenkontrastbild

## Ergebnisse



### **Abbildung 3.9**

Immunfluoreszenz von Kryostatschnitt mit einem Antikörper gegen Villin von Papillae circumvallatae der Ratte; Pfeile zeigen auf die immunreaktive Mikrovillusregion der Geschmacksknospe (Sternchen)

a) a-Villin 1: 200

b) korrespondierendes Phasenkontrastbild

## 4 Diskussion

Ausgangspunkt für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war eine Publikation von *Hoon et al.* (1999) die zeigte, dass die zwei linguale Geschmacksrezeptormoleküle T1R1 und T1R2 in einzelnen Geschmacksrezeptorzellen der Zunge zusammen mit Gustducin koexprimiert werden. Gustducin, ein für Geschmackszellen spezifisches G-Protein, das für die Signaltransduktion von süßen und bitteren Geschmacksstoffen eine entscheidende Mediatorfunktion hat, konnte auch außerhalb der Zunge in spezialisierten Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes, den Bürstenzellen, gefunden werden. Dies führte zu der Annahme, dass Bürstenzellen chemorezeptive Eigenschaften besitzen.

Basierend auf diesen bekannten Ergebnissen sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob die beiden Rezeptoren T1R1 und T1R2 auch in Bürstenzellen oder anderen extralingualen Geweben vorkommen.

Mit zwei methodischen Ansätzen sollte die mögliche Expression von T1R1 und T1R2 untersucht werden. Zum einen durch Nachweis der mRNA mit Hilfe der In-situ-Hybridisierung (ISH), zum anderen durch den direkten Rezeptornachweis mittels gegen T1R1 und T1R2 gerichtete Kaninchenantikörper.

Die nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung wurde mit Antisense-Sonden, die die gesamte bekannte Sequenz der beiden zu untersuchenden Rezeptoren enthielt, ausgeführt. Aus den Untersuchungen von *Hoon et al.* (1999) war die Häufigkeit und Verteilung von T1R1 und T1R2 in den einzelnen Geschmackspapillen der Zunge annähernd bekannt. Basierend auf diesen Daten wurden die jetzt erfolgten In-situ-Hybridisierungsuntersuchungen für T1R1 an Papillae foliatae und für T1R2 an Papillae circumvallatae durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten für T1R1 sowie T1R2 ein unterschiedliches Ausmaß in Auftreten und Intensität der Färbungen. Die Häufigkeit von T1R1 erwies sich gegenüber der von T1R2 als zahlenmäßig geringer, wie auch an Intensität schwächer. Dies lag wohl zum einen an der unterschiedlichen Anzahl von Geschmacksknospen, die diese beiden Papillen enthielten, wie auch an den schon von *Hoon et al.* (1999) beobachteten unterschiedlichen Häufigkeiten dieser einzelnen Rezeptoren in den verschiedenen Geschmackspapillen (siehe Tabelle 1.2).

Anschließend wurde versucht, Antikörper gegen T1R1 und T1R2 zu generieren. Als

## Diskussion

---

Antigen für eine Immunisierung von Kaninchen sollte ein synthetisch hergestelltes Fusionsprotein dienen. Dieser Ansatz wurde gewählt, da die Reinigung und Anreicherung des nativen Proteins aus Rattengewebe selbst mit einem enormen präparativen Aufwand nur wenig erfolgversprechend wäre. Zur Klonierung wurden jeweils unterschiedlich große Abschnitte der extrazellulären Domäne, sowie zwei unterschiedliche Induktionsvektoren, eingesetzt. Nach der erfolgreichen Klonierung der einzelnen Sequenzen in die jeweiligen Expressionsvektoren, scheiterte deren Induktionen trotz zahlreicher Versuche. Möglicherweise wurden hierbei lytische Prozesse von den Bakterien auf das hergestellte Fusionsprotein ausgeübt.

Zum anderen wurde parallel zu diesen Versuchen die Antikörperproduktion gegen synthetisch hergestellte Peptide unternommen. *Hoon et al.* (1999) lokalisierte mit so hergestellten Antikörpern den Geschmacksrezeptor T1R1. Sein Peptid-Antikörper war gegen einen C-terminal gelegenen intrazellulären Abschnitt des Rezeptors gerichtet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Peptid-Antikörper gegen einen dem N-terminalen Ende der beiden Rezeptoren sehr nahe gelegenen Abschnitt gerichtet. Es wurde dabei eine rezeptorspezifische Auswahl des Sequenzabschnittes getroffen. Die Peptidsequenzen erwiesen sich in den durchgeführten Hydrophobizitäts-Untersuchungen als hydrophil und damit potentiell antigen. Die geringen Sequenzhomologien der beiden gewählten Sequenzen sollten das Risiko entstehender Kreuzreaktivitäten bei der Immunfluoreszenz zwischen den beiden Rezeptorantikörpern ausschliessen.

Die nach jeder Immunisierung der sechs VersuchsKaninchen gewonnenen Seren wurden unter Anwendung der Dot-Blot-Analyse auf eine eventuelle Antikörperproduktion hin untersucht. Positive Ergebnisse der Dot-Blot-Analyse wurden durch ELISA-Untersuchungen bestätigt. Mit Hilfe der so gewonnenen Antikörper konnten T1R1 und T1R2 in verschiedenen Geweben der Ratte mit Immunfluoreszenz untersucht werden.

Dies wurde zunächst an Papillae circumvallatae der Rattenzunge sowohl für T1R1 wie auch für T1R2 durchgeführt. Diese Papillen wurden zum einen wegen ihrer Größe und somit leichteren Präparation der Schnitte für die Immunfluoreszenz gewählt. Zum anderen sind in diesen Papillen sowohl T1R1, als auch T1R2 lokalisiert. Durch die Wahl der Papillae circumvallatae konnten die Untersuchungen von T1R1 und T1R2 direkt miteinander verglichen werden.

## Diskussion

---

Die beiden für T1R1 und T1R2 spezifischen Peptidantikörper reagierten selektiv mit dem Bereich der Geschmackspore der meisten Geschmacksknospen der Papillae circumvallatae. Die Geschmacksporen enthalten die rezeptortragenden Mikrovilli der Geschmackszellen. Es war folglich naheliegend, dass beide Antikörper mit den Mikrovilli der Geschmacksrezeptorzellen reagierten. Dieser Eindruck wurde durch vergleichende Immunanfärbungen mit einem Antikörper gegen das Mikrovillusprotein Villin bestätigt. Auffällig war, dass bei weitem nicht jede einzelne der in der Phasenmikroskopie erkennbaren Geschmacksporen eine Immunreaktivität zeigte. Manche Geschmacksporen wurden nur sehr schwach angefärbt. Die mit T1R1-Antikörpern angefärbten Papillen zeigten eine wesentlich geringere Anzahl an gefärbten Geschmacksporen, als die mit T1R2-Antikörpern inkubierten Papillen.

Dies lässt sich durch unterschiedliche Denkansätze deuten. *Hoon et al.* (1999) erkannte, dass nicht alle Geschmacksknospen von Papillae circumvallatae einen der beiden Rezeptoren enthalten. Ungefärbte Geschmacksporen könnten zu denjenigen Geschmacksknospen gehören, welche weder T1R1 noch T1R2 in ihren Zellmembranen enthalten. Es wurde von *Hoon et al.* (1999) auch erkannt, dass die einzelnen Rezeptoren mit unterschiedlichen Häufigkeiten in den Papillae circumvallatae auftauchten. Diese Häufigkeiten stimmten mit den hier beobachteten überein, wenn auch exakte Auszählungen nicht durchgeführt wurden. Diese Häufigkeitsverteilungen lassen somit die unterschiedliche Intensität der Immunreaktionen der Mikrovillusregionen der Geschmacksrezeptorzellen erklären. Positive Ergebnisse konnten nur an Kryostatschnittpräparaten nicht jedoch an Semidünnschnittpräparaten festgestellt werden. Kryostatschnitte sind mit ca. 8  $\mu\text{m}$  im Bezug auf den Durchmesser einer Geschmackspore (4-10  $\mu\text{m}$ ) zwar ausreichend dick, so dass wohl einige Mikrovillusbüschel sicher in diesem Schnitt vorhanden sind. Kryostatschnittpräparate sind aber im Gegensatz zu Semidünnschnittpräparaten für weitere Untersuchungen ungeeigneter. So liegt die Vermutung nahe, dass einige Immunreaktionen unerkannt blieben. Verglichen mit den parallel durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit Antikörpern gegen Villin, konnte von einer Anfärbung der Mikrovilli ausgegangen werden, da sich ähnliche Anfärbemuster ergaben.

Diesen Ergebnissen ähnlich waren die Versuche mit den aus Kaninchenserum gewonnenen affinitätsgereinigten Antikörpern. Diese wurden zunächst ebenfalls nur an

## Diskussion

---

Gewebe der Papillae circumvallatae von Ratten durchgeführt. Es ließ sich wiederum erkennen, dass nicht jede Geschmackspore eine Immunreaktivität zeigte. Manche Geschmacksporen wurden nur sehr schwach angefärbt. Ebenso bestanden erneut Verteilungsunterschiede zwischen den Anfärbemustern der T1R1- und T1R2- Antikörpern.

Mit den affinitätsgereinigten Antikörpern wurden anschließend Inhibitionsversuche durch Präabsorption mit den entsprechenden antigenen Peptiden durchgeführt. Erwartungsgemäß reagierten die absorbierten Antikörper nicht mit den Mikrovillusregionen der Geschmacksrezeptorzellen. Wurden die Antikörper jedoch mit dem Peptid des jeweils anderen Rezeptortyps vorinkubiert, wurde die Immunreaktivität nicht unterdrückt. Diese Versuche legten nahe, dass es sich bei den produzierten Antikörpern um T1R1- bzw. T1R2-spezifische Antikörper handelte. Eine Kreuzreaktivität, die auch bei der Auswahl der Peptide berücksichtigt wurde, konnte ausgeschlossen werden. Es erfolgten auch hier Parallelinkubationen mit Antikörpern gegen Villin, um nachzuweisen, dass Mikrovilli der Geschmacksrezeptorzellen in den Gewebeschnitten enthalten und für die Antikörper zugänglich waren.

Diese Daten ließen auf das Vorhandensein der Geschmacksrezeptoren T1R1 und T1R2 in Papillae circumvallatae der Ratte schließen. Dieser Nachweis gelang unter Anwendung einer von *Hoon et al.* (1999) abweichenden Peptid-Sequenz, die als Antigen für die Antikörperproduktion diente.

Die den von *Hoon et al.* (1999) gewonnenen Daten sehr ähnlichen Resultate stützten diese Ergebnisse. Auch die im Anschluß an diese Versuche durchgeführten Inkubationen mit nativen Seren, welche von der Arbeitsgruppe um *Hoon et al.* (1999) zur Verfügung gestellt wurde, trug hierzu bei. Sie erbrachten ebenso die schon oben erwähnten und mit den hier dargelegten Ergebnissen vergleichbaren Resultate.

Hieran schloss sich die weitere Suche nach T1R1- und T1R2-Geschmacksrezeptoren in extralingualen Geweben an. Diese weiteren Untersuchungen basierten zum einen auf den Erkenntnissen von *Höfer et al.* (1996), sowie *Höfer* und *Drenckhahn* (1998), die das G-Protein Gustducin im Magen und im Pancreasgang nachweisen konnten. Zum anderen basierten sie auf der teilweisen und oben schon erwähnten Koexpression dieser beiden Rezeptoren mit Gustducin in Geschmacksrezeptorzellen.

Schwerpunkte wurden hierbei auf Gewebe der Cardia des Magens, des büstenzellreichen Duodenums, sowie dem Pancreasgang der Ratte gelegt. Trotz der Spezifität der verschiedenen Antikörper gegen T1R1 und T1R2 konnten keinerlei Hinweise dafür gefunden werden, dass sich die Rezeptormoleküle in einem dieser Gewebe befinden. Die Versuche wurden auch unter verschiedenen Bedingungen und Verdünnungen nur mit negativem Erfolg durchgeführt. Die zuvor durchgeführten In-situ-Hybridisierungen an denselbigen Geweben des Gastrointestinaltraktes fielen ebenfalls negativ aus. Ebenso negativ fielen die Untersuchungen dieser Gewebe mit den zur Verfügung gestellten nativen Seren der Arbeitsgruppe von *Hoon et al.* (1999) aus.

Auch hierfür gibt es folgende Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen seien hier die Schnittthicken der Kryostatschnittpräparate im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen erneut erwähnt. Zum anderen sind T1R1, T1R2 und Gustducin nur in sehr geringem Ausmaß koexprimiert. Somit stellen die Zellen mit Koexpression eine kleine Anzahl dar und wurden bei den Versuchen eventuell gar nicht untersucht. Desweiteren konnte auch der dritte bislang bekannte und zu der T1R-Rezeptorfamilie zählende Geschmacksrezeptor T1R3 noch nicht in Geweben des Gastrointestinaltraktes entdeckt werden. Dies könnte auf ein generelles Fehlen der T1R-Geschmacksrezeptorfamilie im Gastrointestinaltrakt hindeuten.

Weitere Immunfluoreszenzuntersuchungen an Gewebeschnitten von Lunge, Retina, Leber, Niere und Herz der Ratte erbrachten sowohl mit den bei dieser Arbeit hergestellten, als auch mit den von *Hoon et al.* (1999) überlassenen T1R1- und T1R2-Antikörpern keine positiven Ergebnisse. Ebenso negativ fielen die an diesen Geweben durchgeführten In-situ-Hybridisierungen aus.

Für eine Klärung der genauen Funktion und Auftretens der Geschmacksrezeptoren T1R1 und T1R2 könnten sicherlich entsprechende Versuche an menschlichen Geweben beitragen. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt.

Dass sich vermeintliche Geschmacksrezeptoren auch außerhalb von lingualen Geweben befinden, konnte in den letzten Jahren häufiger nachgewiesen werden.

So konnte die DNA-Sequenz von T1R3 mittels RT-PCR auch im Hoden (*Kitagawa et*

## Diskussion

---

*al.*, 2001) nachgewiesen werden. Dieses Organ enthält auch andere Geschmacksrezeptoren, wie z.B. die Familie der TRB-Geschmacksrezeptoren (*Matsunami et al.*, 2000).

Ebenso konnte die mit Gustducin in Verbindung stehende und 40-80 Mitglieder enthaltene T2R-Bitter-Geschmacksrezeptorfamilie (*Adler et al.*, 2000), in Geweben außerhalb der Zunge detektiert werden (*Chandrashekar et al.*, 2000).

Die Untergruppe 3 der IP<sub>3</sub>R (1,4,5-triphosphat Rezeptor) ist eine Rezeptorengruppe, die sich vornehmlich in Mikrovilli von Enterozyten des Jejunums, sowie Azinuszellen des Pancreas befindet. In Geschmacksknospen der Papillae circumvallatae von Ratten konnte eine Koexpression dieser IP<sub>3</sub>-Rezeptorengruppe mit dem Geschmacksrezeptor T1R2, sowie mit dem G-Protein Gustducin gezeigt werden (*Asano-Miyoshi et al.*, 2001). Diese Ergebnisse könnten nahelegen, dass diese IP<sub>3</sub>-Rezeptoren in den gastrointestinalen Geweben, in denen sie hauptsächlich vertreten sind, auch mit T1R2 koexprimiert sein können. Auch dieser Umkehrschluß lässt ein extralinguales Auftreten von Geschmacksrezeptoren vermuten.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war durch In-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie zu prüfen, ob die gustatorischen Rezeptormoleküle T1R1 und T1R2 auch außerhalb von Geschmacksknospen vorkommen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Bürstenzellen in verschiedenen Abschnitten des Respirations- und Gastrointestinaltraktes gelegt.

In vorrausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde das für Geschmackszellen spezifische G-Protein Gustducin auch außerhalb der Zunge entdeckt, hauptsächlich in Bürstenzellen des Magen-Darm-Traktes. Bürstenzellen wurden deshalb als mögliche chemorezeptive Epithelzellen angesehen. Gustducin spielt für den Signalweg der süßen und bitteren Geschmackstoffe in Geschmacksrezeptorzellen der Zunge eine entscheidende Rolle. Die beiden Geschmacksrezeptormoleküle T1R1 und T1R2 werden zusammen mit Gustducin in einzelnen Geschmacksrezeptorzellen koexprimiert (siehe Tabelle 1.3). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Signalwege dieser Rezeptormoleküle an Gustducin gekoppelt sind.

Es stellte sich daher die Frage, ob T1R1 und T1R2 auch im Magen-Darm-Trakt oder anderen Zelltypen vorkommen.

Zur Klärung der Expression dieser Rezeptormoleküle wurde zunächst die In-situ-Hybridisierung eingesetzt, um die mRNA von T1R1 und T1R2 nachzuweisen. Ein positives Signal konnte nur in den Geschmacksknospen der Zunge, nicht jedoch in extralingualem Geweben nachgewiesen werden.

Desweiteren wurde versucht, Fusionsproteine gegen Abschnitte der extrazellulären Domänen der beiden Rezeptoren herzustellen. Diese sollte als Antigene zur Generierung von Rezeptor-spezifischen Antikörpern dienen. Der Versuch die Fusionsproteine bakteriell zu exprimieren scheiterte an der Induktion.

Parallel hierzu wurden synthetische Peptide von den T1R1- und T1R2-Sequenzen hergestellt, um entsprechende Rezeptor-spezifische Peptid-Antikörper zu erhalten. Die durch Immunisierung von Kaninchen gewonnenen Seren wurden anschließend zu immunhistochemischen Untersuchungen an verschiedenen Gewebestücken der Ratte eingesetzt. Dies geschah insbesondere an der Zunge und dem Gastrointestinaltrakt. Beide Rezeptoren wurden in der vorliegenden Arbeit durch Peptid-Antikörper im Mikrovil-

## Zusammenfassung

---

lusbereich der Geschmacksrezeptorzellen nachgewiesen. Auch die aus den nativen Seren hergestellten affinitätsgereinigten Antikörper erbrachten wie auch schon die In-situ-Hybridisierungsuntersuchungen positive Ergebnisse. Somit gelang der Nachweis dieser beiden Rezeptoren im linguale Gewebe.

Die Spezifität der Immunfärbungen konnte durch Präabsorption mit den immunogenen Peptiden nachgewiesen werden.

An extralingualen Geweben und hier vornehmlich Geweben des Magen-Darm-Traktes konnte jedoch kein Nachweis eines der beiden Rezeptoren T1R1 und T1R2 gefunden werden.

So konnten die von *Hoon et al.* (1999) erbrachten Ergebnisse zwar bestätigt werden, aber die Arbeitshypothese einer Expression dieser Geschmacksrezeptormoleküle in Bürstenzellen nicht verifiziert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

**Adler, E.; Hoon, M. A.; Mueller, K. L.; Chandrashekar, J.; Ryba, N. J. P.;**

**Zuker, C. S. (2000)**

A novel family of mammalian taste receptors

*Cell*, 100: 693-702

**Anderson, D. J.; Peterson, C. (1981)**

High resolution electrophoresis of proteins in SDS polyacrylamide gels

*Electrophoresis*: 41-48; B. J. Radola ed.

**Arey, L.; Tremaine, M.; Monzingo, F. (1935)**

The numerical and topographical relations of taste buds to human circumvallate papillae throughout the life span

*Anat. Rec.*, 64: 9-25

**Asano-Miyoshi, M.; Abe, K.; Emori, Y. (2001)**

IP<sub>3</sub> receptor type 3 and PLCβ<sub>2</sub> are co-expressed with taste Receptors T1R and T2R in rat taste bud cells

*Chem. Senses*, 26: 259-265

**Azzali, G. (1997)**

Ultrastructure and immunocytochemistry of gustatory cells in man

*Ann. Anat.*, 179: 37-44

**Bachmanov, A. A.; Reed, D. R.; Ninomiya, Y.; Inoue, M.; Tordoff, M. G.; Price, R. A.; Beauchamp, G. K. (1997)**

Sucrose consumption in mice: Major influence of two genetic loci affecting peripheral sensory responses

*Mamm. Genome*, 8: 545-548

**Baradi, A. F.; Bourne, G. H. (1953)**

Gustatory and olfactory epithelia

*Int. Rev. Cytol.*, 2: 289-330

**Blizard, D.; Kotlus, B.; Frank, M. (1999)**

Quantitative trait loci associated with short-term intake of saccharin and quinine solutions in laboratory mice

*Chem. Senses*, 24: 373-385

**Brown, E. M.; Gamba, G.; Riccardi, D.; Lombardi, M.; Butters, R.; Kifor, O.; Sun, A.; Hediger, M. A.; Lytton, J.; Herbert, S. C. (1993)**

Cloning and characterization of an extracellular Ca<sup>2+</sup> sensing receptor from bovine parathyroid

*Nature*, 366: 575-580

**Caicedo, A.; Roper, S. D. (2001)**

Taste receptor cells that discriminate between bitter stimuli

*Science*, 291: 1557-1560

**Cao, Y.; Oh, B.; Streyer, L. (1998)**

Cloning and localization of two multigene receptor families in goldfish olfactory epithelium

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 11987-11992

**Capeless, C. G.; Whitney, G. (1995)**

The genetic basis of preference for sweet substances among inbred strains of mice: preference ratio phenotypes and the alleles of the Sac and dpa loci

*Chem. Senses*, 20: 291-298

**Candhari, N.; Landin, A. M.; Roper, S. D. (2000)**

A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor  
*Nat. Neurosci.*, 3: 113-119

**Chandrashekar, J.; Mueller, K.; Hoon, M. (2000)**

T2Rs function as bitter taste receptors  
*Cell*, 100: 703-711

**Drenckhahn, D.; Jöhns, T.; Schmitz, F. (1993)**

Production of polyclonal antibodies against proteins and peptides  
*Methods in Cell Biology*, 37: 8-54

**Drenckhahn, D.; Wagner, J. (1986)**

Stress fibres in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix and contractility  
*J. Cell Biol.*, 102: 1738-1747

**Delay, R.; Kinnamon, J.; Roper, S. (1986)**

Ultrastructure of mouse vallate taste buds. II. Cell types and cell lineage  
*J. Comp. Neurol.*, 253: 242-252

**Fuller, J. L. (1974)**

Single-locus control of saccharin preference in mice  
*J. Hered.*; 65: 33-36

**Farbman, A. I. (1965)**

Fine structure of the taste bud  
*J. Ultrastruct. Res.*, 12: 328-350

**Gilbertson, T. A.; Damak, S.; Margolskee, R. F. (2000)**

The molecular physiology of taste transduction

*Curr. Opin. Neurobiol.*, 10(4): 519-527

**Gilbertson, T. A.; Boughter, J. D.; Huai, Z.; Smith, D. V. (2001)**

Distribution of gustatory sensitivities in rat taste cells: Whole-cell responses to apical chemical stimulation

*J. Neurosci.*, 21(13): 4931-4941

**Herness, M. S.; Gilbertson, T. A. (1999)**

Cellular mechanisms of taste transduction

*Annu. Rev. Physiol.*, 61: 873-900

**Herrada, G.; Dulac, C. (1997)**

A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution

*Cell*, 90: 763-773

**Hoon, M.; Adler, E.; Lindemeier, J.; Battey, J.; Ryba, N.; Zuker, C. (1999)**

Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity

*Cell*, 96: 541-551

**Höfer, D.; Püschel, B.; Drenckhahn, D. (1996)**

Taste receptor-like cells in the rat gut identified by expression of  $\alpha$ -Gustducin

*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 93: 6631-6634

**Höfer, D.; Drenckhahn, D. (1998)**

Identification of the taste cell G-protein,  $\alpha$ -Gustducin, in brush cells of the rat pancreatic duct system

*Histochem. Cell Biol.*, 110: 303-309

**Höfer, D.; Drenckhahn, D. (1999)**

Localisation of actin, villin, fimbrin, ezrin and ankyrin in rat taste receptor cells  
*Histochem. Cell Biol.*, 112: 79-86

**Kaupmann, K.; Huggel, K.; Heid, J.; Flor, P. J.; Bischoff, S.; Mickel, S. J.; McMaster, G.; Angst, C.; Bittiger, H.; Froestl, W.; Bettler, B. (1997)**

Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors  
*Nature*, 386: 239-246

**Kinnamon, S. C.; Cummings, T. A. (1992)**

Chemosensory transduction mechanisms in taste  
*Annu. Rev. Physiol.*, 54: 715-731

**Kinnamon, S. C. (1996)**

A bitter-sweet beginning  
*Nature*, 381: 737-738

**Kitagawa, M.; Kusakabe, Y.; Hirohito, M.; Ninomiya, Y.; Hino A. (2001)**

Molecular genetic identification of a candidate receptor gene for sweet taste  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 283: 236-242

**Kölliker, A. (1855)**

Handbuch der Gewebelehre  
*Verlag von Wilhelm Engelmann (Leipzig, Deutschland)*

**Kunishima, N.; Shimada, Y.; Tsuji, Y.; Sato, T.; Yamamoto, M.; Kumasaka, T.; Nakanishi, S.; Jingami, H.; Morikawa, K. (2000)**

Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor  
*Nature*, 407: 971-977

**Kyhse-Anderson, J. (1984)**

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose

*J. Biochem. Biophys. Methods*, 10: 203-209

**Kyte, J.; Doolittle, R. F. (1982)**

A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein

*J. Mol. Biol.*, 157: 105

**Laemmli, U. K. (1970)**

Cleavage of structural proteins during the Assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>

*Nature*, 227: 680-685

**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

*Mamm. Genome*, 12: 13-16

**Lindemann, B. (2001)**

Receptors and transduction in taste

*Nature*, 413: 219-225

**Lindemann, B. (1999)**

Receptor seeks ligand: on the way to cloning the molecular receptors for sweet and bitter taste

*Nature Medicine*, 5: 381-382

**Lindemann, B. (1996)**

Taste reception

*Physiol. Rev.*, 76: 718-766

**Lindemann, B. (1996)**

Chemoreception: Tasting the sweet and bitter

*Curr. Biol.*, 6: 1234-1237

**Lush, I. E. (1989)**

The genetics of tasting in mice. VI. Saccharin, acesulfame, dulcin and sucrose

*Genet. Res.*, 53: 95-99

**Lush, I. E.; Hornigold, N.; King, P.; Stoye, J. P. (1995)**

The genetics of tasting in mice. VII. Glycine revisited, and the chromosomal location of Sac and Soa

*Genet. Res.*, 66: 167-174

**Margolskee, R. F. (1993)**

The molecular biology of taste transduction

*BioEssays*, 15(10): 645-650

**Matsunami, H.; Buck, L. B. (1997)**

A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals

*Cell*, 90: 775-784

**Matsunami, H.; Montmayeur, J. P.; Buck, L. B. (2000)**

A family of candidate taste receptors in human and mouse

*Nature*, 404: 601-604

**Max, M.; Shanker, Y. G.; Huang, L.; Rong, M.; Liu, Z.; Campagne, F.;**

**Weinstein, H.; Damak, S.; Margolskee, R. F. (2001)**

Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac

*Nature Genetics*, 28: 58-63

**McLaughlin S. K.; McKinnon, P. J.; Margolskee, R. F. (1992)**

Gustducin is a taste-cell-specific G-Protein closely related to the transducin

*Nature*, 357: 563-569

**Montamayeur J. P.; Liberles, S.; Matsunami, H.; Buck, L. (2001)**

A candidate taste receptor gene near sweet taste locus

*Nature Neuroscience*, 4(5): 492-498

**Murray, R. G. (1971)**

Ultrastructure of taste receptors

*Handbook of sensory Physiology IV; Chemical senses and taste (part II)*,  
Springer-Verlag

**Naito, T.; Saito, Y.; Yamamoto, J.; Nozaki, Y.; Tomura, K.; Hazama, M.; Nakanishi, S.; Brenner, S. (1998)**

Putative pheromone receptors related to the Ca<sup>2+</sup> sensing receptor in Fugu

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 5178-5181

**Nakanishi, S. (1992)**

Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain functions

*Science*, 258: 597-603

**Nelson, G. M. (1998)**

Biology of taste buds and the clinical problem of taste loss

*Anat. Rec. (New Anat.)*, 253: 70-78

**Nelson, G.; Hoon, M. A.; Chandrashekar, J.; Zhang, Y.; Ryba, N. J. P.;**

**Zuker, C. S. (2001)**

Mammalian sweet taste receptors

*Cell*, 106: 381-390

**Ninomiya, Y.; Funakoshi, M. (1993)**

Genetic and neurobehavioral approaches to the taste receptor mechanism in mammals

*Mechanisms of Taste Transduction, CRC-Press Boca Raton, FL: 253-272*

**Okamoto, T.; Sekiyama, N.; Otsu, M.; Shimada, Y.; Sato, A.; Nahanishi, S.;**

**Jingami H. (1998)**

Expression and purification of the extracellular ligand binding region of metabotropic glutamate receptor subtype 1

*J. Biol. Chem.*, 273: 13089-13096

**Reutter, K.; Witt, M. (1993)**

Morphology of vertebrate taste organs and their nerve supply

*Mechanisms of Taste Transduction, CRC-Press Boca Raton, FL: 29-82*

**Roper, S. D. (1989)**

The cell biology of vertebrate taste receptors

*Ann. Rev. Neurosci.*, 12: 329-353

**Royer, S. M.; Kinamon, J. C. (1988)**

Ultrastructure of mouse foliate taste buds: synaptic and nonsynaptic interactions between taste cells and nerve fibres

*J. Comp. Neurol.*, 270: 11-24

**Ruiz-Avila, L.; Wong, G. T.; Damak, S.; Margolskee, R. F. (2001)**

Dominant loss of responsiveness to sweet and bitter compounds caused by a single mutation in  $\alpha$ -Gustducin

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (15): 8868-8873

**Ryba, N. J. P.; Tirindelli, R. (1997)**

A new multigene family of putative pheromone receptors

*Neuron*, 19: 371-379

**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

*J. Neurochem.*, 77: 896-903

**Sheibani, N.; Frazier, W. A. (1998)**

Direct use of synthetic peptides for antiserum productions

*BioTechniques*, 25: 28-31

**Simon S. A.; Roper, S. D. (1993)**

Mechanisms of taste transduction

*CRC-Press Baton Rouge, FL*: 30-82

**Smith, D. V.; Margolskee, R. F. (2001)**

Making sense of taste

*Sci. Am.*, 284(3): 26-33

**Specca, D. J.; Lin, D. M.; Sorensen, P. W.; Isacoff, E. Y.; Ngai, J.;**

**Dittmann, A. H. (1999)**

Functional identification of a goldfish odorant receptor

*Neuron*, 23: 487-498

**Stewart, R. E.; DeSimone, J. A.; Hill, D. L. (1997)**

New perspectives in gustatory physiology: transduction, development, and plasticity

*Am. J. Physiol*, 272: C1-C26

**Takahashi, K.; Tsuchida, K.; Tanabe, Y.; Masu, M.; Nakanishi, S. (1993)**

Role of the large extracellular domain of metabotropic glutamate receptors in agonist selectivity determination

*J. Biol. Chem.*, 268: 19341-19345

**Wong, G. T.; Kimberley, S. G.; Margolskee, R. F. (1996)**

Transduction of bitter and sweet taste by gustducin

*Nature*, 281: 796-80

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Detlev Drenckhahn für die Überlassung des Themas, der intensiven Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte Herrn PD Dr. Dirk Höfer sowie Frau Gabriele Lang sehr herzlich danken. Ohne die ständige Beratung und Hilfe von Dirk und Gabi wäre die Durchführung meiner Arbeit kaum möglich gewesen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Institutes für die fachlichen Tips, die netten Unterhaltungen und so manchen Scherz. Dieses gute Arbeitsklima trug ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit bei.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Löser  
Vorname: Andreas Johannes  
Geburtsdatum: 22. 04. 1976  
Geburtsort: Bad Neustadt/S.  
Anschrift: Andreas-Grieser-Strasse 81  
97084 Würzburg  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

1983 1986: Grundschule Bad Neustadt/ S.  
1986 1995: Rhön- Gymnasium Bad Neustadt/ S.  
01/1992 – 04/1992 St. Andrew´s School Leatherhead, England

### Bundeswehr:

07/1995 - 09/1995: Grundausbildung: Sanitätsschule der Luftwaffe Giebelstadt  
10/1995 - 04/1996: Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Station Neurologie und Psychiatrie

### Hochschulbildung:

05/1996 - 11/2002: Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg  
03/1998: Ärztliche Vorprüfung  
04/1999: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
05/1999: Beginn der Dissertation am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg  
09/2001: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2002: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

---

**Famulaturen:**

- 09/1998: Allgemeinchirurgie des LKH Villach, Österreich  
10/1998: Unfallchirurgie des LKH Villach, Österreich  
08/1999 - 09/1999: Department of Accident and Emergency des Belfast City Hospital, Nordirland  
10/1999: Chirurgie (Praxisfamulatur) in Würzburg  
09/2000: Urologie des Kreiskrankenhauses Stade

**Praktisches Jahr:**

- 10/2001 - 01/2002: Chirurgie des Leopoldina Krankenhauses Schweinfurt  
02/2002 - 05/2002: Innere Medizin der University of South Alabama, Mobile, Alabama, USA  
06/2002 - 09/2002: Urologie der Universität Würzburg

**Sonstiges:**

- 03/1998: Prüfung zum Rettungssanitäter  
10/1999 - 02/2000: Tutor im Präparierkurs am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Universität Würzburg

**Arzt im Praktikum:**

- 01/2003: Klinik für Chirurgie des Kantonsspitals Grabs, Schweiz