

„Die Identifizierung und Charakterisierung humaner Bittergeschmacksstoffantagonisten“

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Kristina Blank
aus Rüdersdorf

2018

Diese Arbeit wurde angefertigt am Deutschen Institut für Ernährungsforschung in der Abteilung Molekulare Genetik (Prof. Dr. Meyerhof) von Oktober 2011 bis Juli 2018.

1. Gutachter: Dr. habil. Maik Behrens
Leibniz-Institut für Lebensmittel-Systembiologie Technische
Universität München
Lise-Meitner-Str. 34
85354 Freising

2. Gutachterin: Prof. Dr. Beate Koksch
Freie Universität von Berlin
Institut für Chemie und Biochemie
Takusstraße 3
14195 Berlin

Disputation am: 27.09.2019

Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Wolfgang Meyerhof für die Möglichkeit in seiner Abteilung meine Dissertation anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. habil. Maik Behrens für die wissenschaftliche Anleitung und die vielen hilfreichen Diskussionen. Vor allem aber gilt Ihm mein Dank für die Unterstützung in der Endphase, ohne die ich diese Arbeit nicht abschließen hätte können.

Ich danke meinen vielen Kollegen, die ich während meiner Zeit am Institut, kennen lernen durfte für die gute Zusammenarbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Alessandro Marchiori und Anne Brockhoff für die Unterstützung und die wissenschaftlichen Diskussionen. Anke Lingenauber und Ulrike Redel danke ich für die tatkräftige Hilfe in allen Lebenslagen und Sandra Hübner für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die vielen guten Tipps beim Schreiben dieser Arbeit. Bei Kristina Loßow bedanke ich mich für das Bereitstellen der experimentellen Daten.

Die Substanz FL101237 wurde vom Kooperationspartner Jay Slack (Givaudan Flavors Corporation, Cincinnati, USA) zur Verfügung gestellt. Auch dafür möchte ich mich bedanken.

Ich möchte mich auch bei meinen Freunden bedanken, vor allem bei Romina Gutsch und Julia Knospe für die unzähligen Gespräche und ihre Geduld.

Vor allem danke ich meiner Familie für Ihre unermüdliche moralische Unterstützung und den Zuspruch. Ich danke Euch für den unerschütterlichen Glauben an die Realisierung dieser Doktorarbeit. Ich danke meinem Sohn Sebastian, der mich jeden Tag zum Lachen bringt und mir immer wieder zeigt, was wirklich zählt im Leben.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Publikationen	V
1. Einleitung	1
1.1 Die Grundlagen des Geschmackssinns	1
1.2 Der Bittergeschmack	3
1.3 Die Bittergeschmacksrezeptoren	5
1.4 Inhibitoren des Bittergeschmacks	11
1.5 Zielstellung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geschmacksstoffe	19
2.1.2 Enzyme und Kits.....	19
2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.4 Geräte	20
2.1.5 Datenbanken und Computerprogramme.....	20
2.1.6 TAS2R-Haplotypen.....	21
2.1.7 Plasmide.....	22
2.1.8 Primer	23
2.1.9 Humane Zelllinie	23
2.1.10 Nährmedien für HEK 293T	23
2.1.11 Bakterienstämme.....	23
2.1.12 Nährmedien für Bakterien	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Retransformation von Bakterien.....	25
2.2.2 Plasmidisolation.....	25
2.2.3 Photometrische Messung von Plasmid-DNA.....	25
2.2.4 Restriktionsanalyse.....	26
2.2.5 Agarosegelelektrophorese	26
2.2.6 Sequenzierung	27
2.2.7 Kultivierung der HEK 293T G _{α16Gust44} Zelllinie	27

2.2.8 Beschichten von Kulturgefäßen	27
2.2.9 Transfektion von HEK293T G _{α16Gust44} Zellen	28
2.2.10 Funktionelle Calciummessungen	28
2.2.11 Calcium-Messungen durch das Fluoreszenzplattengerät FLIPR ^{Tetra}	29
2.2.12 Vorbereitung der Ligandenplatten.....	31
2.2.13 Auswertung der Calcium-Messungen	32
3. Ergebnisse	34
3.1 Identifizierung neuer Antagonisten von Bittergeschmacksstoffrezeptoren.....	34
3.1.1 Antagonisten von TAS2R43.....	42
3.1.2 Antagonisten von TAS2R16 und TAS2R38.....	43
3.1.3 Antagonisten von TAS2R10, TAS2R14 und TAS2R46	45
3.1.4 Antagonisten von TAS2R50.....	47
3.1.5 Antagonisten von TAS2R9.....	49
3.1.6 Vergleichende Darstellung aller gefundenen Antagonisten.....	51
3.1.7 Phenanthrolin als breitbandiger Antagonist.....	54
3.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ausgewählter Antagonisten	56
3.2.1 Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Chloroquin	56
3.2.2 Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Phenanthrolin.....	58
3.2.3 Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Allylisothiocyanat	59
3.2.4 Dosis-Wirkungs-Experimente von Antagonisten des TAS2R43	61
3.3 Charakterisierung des Inhibitionsmodus von TAS2R-Antagonisten	62
3.3.1 Inhibitionsmodus von Chloroquin	63
3.3.2 Inhibitionsmodus von Phenanthrolin	65
3.4 Charakterisierung des Inhibitors FL101237	66
3.4.1 FL101237 als breitbandiger TAS2R-Inhibitor	67
3.4.2 FL101237 als Bittergeschmacksrezeptoragonist.....	72
4. Diskussion	74
4.1 Die Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung.....	74
4.1.1 Das Ligandenspektrum der Bittergeschmacksrezeptoren	76
4.1.2 Die individuelle Wirkung der Antagonisten.....	78
4.1.3 Die Dosis-Wirkungsbeziehungen ausgewählter Antagonisten.....	81
4.1.4 Eine natürliche Substanz als breitbandiger Antagonist	83
4.2 Die TAS2R-Spezifität der Inhibition.....	84
4.2.1 Bitterrezeptorunabhängige Einflüsse auf zelluläre Calciumfluktuationen.....	84
4.2.2 Bitterrezeptorspezifität der Antagonisten	86

4.3 Die chemische Diversität der Antagonisten.....	88
4.4 Die Charakterisierung des Inhibitionsmechanismus.....	90
4.5 Das Zusammenspiel der TAS2R-Liganden und deren Bedeutung	91
5. Zusammenfassung.....	94
6. Summary.....	96
7. Literaturverzeichnis	98
8. Bildquellenverzeichnis.....	111
9. Anhang.....	112
9.1 Antagonisten aus der Substanzbibliothek	112
9.2 FL101237 als breitbandiger Inhibitor.....	128
Eidesstattliche Erklärung.....	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lage und Aufbau der Geschmacksknospen.....	2
Abbildung 2: Die ubiquitäre Verbreitung von Bitterstoffen.....	4
Abbildung 3: Signaltransduktion der Bittergeschmacksrezeptoren	6
Abbildung 4: Darstellung eines Bittergeschmacksrezeptors	8
Abbildung 5: Beispiele für Agonisten des TAS2R38 und des TAS2R16	9
Abbildung 6: Agonistenspektrum der humanen Bitterrezeptoren	10
Abbildung 7: Geschmacksintensität des Süßstoffes Saccharin.....	12
Abbildung 8: Inhibition des TAS2R31 durch GIV3727	13
Abbildung 9: Aktivitätsmuster von 3HDC	16
Abbildung 10: Grundlage der Calcium-Messungen.....	29
Abbildung 11: Experimenteller Aufbau der funktionellen Calcium-Messungen.....	32
Abbildung 12: Erste Selektionsrunde der Testsubstanzen auf TAS2R10.....	41
Abbildung 13: Beispiele für Antagonisten von TAS2R43	43
Abbildung 14: Beispiele der Antagonisten von TAS2R16 und -R38.....	44
Abbildung 15: Beispiele der Antagonisten von TAS2R10, -R14 und -R46	46
Abbildung 16: Agonisten des TAS2R46.....	47
Abbildung 17: Beispiele der Antagonisten von TAS2R50	48
Abbildung 18: Beispiele der Antagonisten von TAS2R9	50
Abbildung 19: Phenanthrolin als breitbandiger Antagonist.....	55
Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Experimente des Antagonisten Chloroquin	57
Abbildung 21: Dosis-Wirkungs-Experimente des Antagonisten Phenanthrolin.....	59
Abbildung 22: Dosis-Wirkungs-Experimente des Antagonisten Allylisothiocyanat	60
Abbildung 23: Dosis-Wirkungs-Experimente des TAS2R43 mit verschiedenen Antagonisten.....	61
Abbildung 24: TAS2R10 mit gebundenem Agonist an der orthosterischen Bindungsstelle ...	62
Abbildung 25: Mögliche Auswirkungen eines Antagonisten auf die Dosis-Wirkungs-Kurve eines Rezeptors unter verschiedenen kinetischen Bedingungen	63
Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Chloroquin.....	64
Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Phenanthrolin.....	65
Abbildung 28: Chemische Struktur von FL101237.....	66
Abbildung 29: Bittergeschmacksrezeptoren, welche durch FL101237 vollständig inhibiert werden	70

Abbildung 30: Bittergeschmacksrezeptoren, welche durch FL101237 nicht vollständig gehemmt werden	71
Abbildung 31: FL101237 als Agonist	73
Abbildung 32: Das Ligandenspektrum der TAS2Rs	77
Abbildung 33: Cyclamat und Saccharin als Inhibitor humaner Bittergeschmacksrezeptoren	80
Abbildung 34: Chloroquin als Testsubstanz auf TAS2R14, -R50, -R46	85
Abbildung 35: Vergleichende Darstellung der relativen Fluoreszenzwerte von Erst- und Zweitapplikation	87
Abbildung 36: Die Antagonisten des TAS2R50 und weitere Bitterstoffe	89
Abbildung 37: Dosis-Wirkungs-Experiment von Pirenzepin auf TAS2R9	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antagonisten des Bittergeschmacks, ihre Rezeptoren und die Agonisten, bei denen die Rezeptorantwort reduziert ist.....	14
Tabelle 2: Geräte.....	20
Tabelle 3: verwendete Computerprogramme.....	21
Tabelle 4: verwendete TAS2R-Haplotypen.....	21
Tabelle 5: Primer und deren Sequenz	23
Tabelle 6: Liste der Testsubstanzen	35
Tabelle 7: Auflistung der Testrezeptoren	39
Tabelle 8: Auflistung aller gefundenen Rezeptor-Inhibitor-Paare	51
Tabelle 9: Bittergeschmacksrezeptoren und deren Agonisten	67

Abkürzungsverzeichnis

AITC	Allylthiocyanat	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat		
BGH	Bovines Wachstumshormon	HSV	Herpes-simplex-Virus
bzw.	beziehungsweise	IC50	Effektive Konzentration bei halbmaximaler Inhibition
ca.	circa		
CMV	Humanes Cytomegalievirus	IP3	Inositoltriphosphat
C-Terminus	Carboxyterminales Ende	nH	Hill-Koeffizient
DAG	Diacylglycerol	N-Terminus	Aminoternales Ende
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	OD	Optische Dichte
		PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PLC	Phospholipase C
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat	PROP	Propylthiouracil
		PTC	Phenylthiocarbamid
E.coli	Escherichia coli	SST	Somatostatin
EC50	Effektive Konzentration bei halbmaximaler Aktivierung	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
		TAS1R	Humaner Geschmacksrezeptor der Klasse 1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
ER	Endoplasmatisches Retikulum	TAS2R	Humaner Geschmacksrezeptor der Klasse 2
FCS	Fötales Kälberserum		
FLIPR	Fluorometric Imaging Plate Reader	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
G418	Genitacin	WHO	Weltgesundheitsorganisation
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor		
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen		

Publikationen

Behrens, M.; **Blank, K.**; Meyerhof, W. Blends of Non-caloric Sweeteners Saccharin and Cyclamate Show Reduced Off-Taste due to TAS2R Bitter Receptor Inhibition. *Cell Chemical Biology*. 2017, 24: 1 - 6.

Foster, S. R.; **Blank, K.**; Hoe, L. E. S.; Behrens, M.; Meyerhof, W.; Peart, J. N.; Thomas, W. G. Bitter taste receptor agonists elicit G-protein-dependent negative inotropy in the murine heart. *FASEB Journal*. 2014, 28 (10): 4497 - 4508.

1. Einleitung

1.1 Die Grundlagen des Geschmackssinns

Der Geschmackssinn dient nicht allein dem Genuss und Geschmackserlebnis beim Essen, sondern auch zur Begutachtung der Nahrung, um zum einem die Aufnahme von Toxinen und verdorbener Nahrung zu vermeiden, und zum anderen Nährstoffe zu identifizieren (Chandrashekar et al., 2006; Lindemann, 1996;). Im Allgemeinen werden fünf Grundgeschmacksarten unterschieden: süß, salzig, umami, sauer und bitter. Jeder dieser Geschmacksqualitäten wird eine bestimmte physiologische Funktion zugeordnet. Zur Erkennung von Kohlenhydraten und des Kaloriengehalts von Lebensmitteln fungiert der Süßgeschmack. Über den Sauer- und Salzgeschmack kann der Ionenhaushalt des Körpers reguliert werden, wobei der Geschmacksqualität sauer auch eine Schutzfunktion innewohnt, da unreife Früchte und verdorbenes Essen erkannt werden können (Chaudari und Roper, 2010; Lindemann, 1996). Der Umamigeschmack, welcher beim Menschen durch L-Glutamat und L-Aminosäuren ausgelöst wird, erkennt proteinreiche Nahrung (Nelson et al., 2002). Der Bittergeschmack hingegen wird allgemein als Sensor für toxische Substanzen angesehen, da eine Vielzahl von Bitterstoffen giftig sind (Drewnowski und Gomez-Carneros, 2000; Lindemann, 1996). Ganchrow zeigte bereits 1983 das saure und bittere Stoffe bei Säuglingen eine aversive Reaktion auslösen, den sogenannten aversiven gustofazialen Reflex. Dieses ablehnende Verhalten ist ein Schutzmechanismus gegen giftige und verdorbene Nahrung (Ganchrow et al., 1983).

Die Wahrnehmung von Geschmacksstoffen erfolgt über Rezeptoren (für süß, umami und bitter) bzw. über Ionenkanäle (für salzig und sauer), welche in Geschmacksrezeptorzellen exprimiert werden. Diese wiederum sind zusammengelagert in Geschmacksknospen und sind in der Mundhöhle auf Zunge, Gaumen, Rachen, Kehldeckel und Schlund verteilt (Lindemann, 2001). Die Geschmacksknospen bestehen aus ungefähr 100 Zellen, welche nach der Morphologie und Funktion in vier Zelltypen eingeteilt werden (Miller, 1995). Die Zellen des Typs I übernehmen wahrscheinlich Glia-ähnliche Funktionen. Sie exprimieren das GLAST-Protein (Glutamat-Aspartat-Transporter) und das NTPDase 2-Enzym zum Abbau von ATP (Bartel et al., 2006; Lawton et al., 2000). Des Weiteren detektiert dieser Zelltyp Natrium-Ionen und trägt zusammen mit dem Amilorid-sensitiven Natriumkanal (ENaC, *epithelial sodium channel*) zur Wahrnehmung des Salzgeschmacks bei (Heck et al. 1984; Lin et al. 1999; Vandenbeuch et al. 2008).

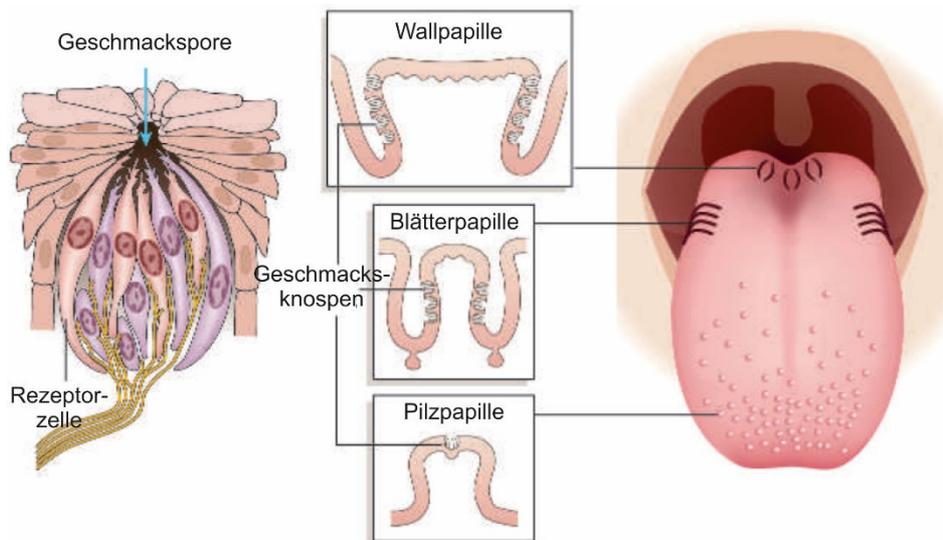


Abbildung 1: Lage und Aufbau der Geschmacksknospen (modifiziert nach Chandrashekar et al., 2006). Dargestellt ist die Organisation der geschmacksvermittelnden Strukturen auf der Zunge. Dabei wird die Lage der Wall-, Blätter- und Pilzpapillen gezeigt.

Zelltyp II exprimiert Komponenten für die G-Protein gekoppelte Signalkaskade und die Süß-, Umami- und Bitterrezeptoren (Nelson et al., 2001; Tomchik et al., 2007). Zellen vom Typ III werden als präsynaptische Zellen angesehen, welche mit den afferenten Nervenfasern Synapsen bilden (DeFazio et al., 2006) und vermutlich den Sauer-Geschmack vermitteln (Huang et al., 2008; Tomichik et al., 2007). Im unteren Bereich der Geschmacksknospen befinden sich die Basalzellen (Zelltyp IV), welche sich zu den anderen Sinneszellen (Zelltyp I bis III) differenzieren können (Beidler und Smallman, 1965; Chaudhari et al., 2010). Die Signaltransduktion zum Gehirn erfolgt über drei Hirnnerven. Die Informationen der Geschmacksinneszellen werden im NTS (*nucleus tractus solitarius*) integriert und im Thalamus und primären gustatorischen Kortex weiterverarbeitet (Chaudhari, 2010; Travers, 1988).

Die Wahrnehmung des Umami- und Süßgeschmacks erfolgt über Heterodimere der TAS1-Rezeptoren (taste receptor family 1). Dabei vermittelt das Heterodimer bestehend aus TAS1R1 und TAS1R3 den Umamigeschmack, die Zusammenlagerung von TAS1R2 und TAS1R3 den Süßgeschmack (Sainz et al., 2001; Nelson et al., 2002).

1.2 Der Bittergeschmack

Bitter schmeckende Substanzen sind allgegenwärtig. In einer Datenbank für Bitterstoffe (BitterDB) befinden sich bereits über 680 Stoffe (Wiener et al., 2011; bitterdb.agri.huji.ac.il/bitterdb). Sie können natürlichen oder synthetischen Ursprungs sein. Bitterstoffe lassen sich nicht einer einzelnen chemischen Gruppe zuordnen, ihre strukturelle Diversität reicht von Metallionen und Aminosäuren über Flavonoide und Fettsäuren bis hin zu Peptiden (Barratt-Fornell und Drewnowski, 2002; Belitz und Wieser, 1985; DuBois et al., 2008; Meyerhof, 2005). Von Pflanzen genutzt als Abwehrstoffe gegen Fraßfeinde, zum Schutz vor oxidativem Stress, Infektionen und der Wirkung von UV-Licht (Biere et al.; 2004; Edreva et al., 2008) finden Bittersubstanzen ebenso eine breite Anwendung in der Medizin, der Chemie und im Alltag. In der Natur kommen wahrscheinlich mehrere tausend Bitterstoffe vor (Meyerhof et al., 2010a). Nach Schätzungen synthetisieren zehn Prozent der Pflanzen toxische sekundäre Metabolite (Kingsbury, 1964; Zagrobelny et al., 2004). In mindestens 2500 Pflanzenarten kommen cyanogene Glykoside, wie zum Beispiel Amygdalin, vor (Vetter, 2000). Die Pflanzen speichern das Sekundärmetabolit in Vakuolen. Beim Fressen der Pflanze wird durch das Zerstören der Zelle das Glykosid freigesetzt und die HCN-Gruppe spaltet sich enzymatisch ab (Vetter, 2000). Die dabei entstehende Blausäure führt zu Vergiftungserscheinungen, wie zum Beispiel Übelkeit (Vetter, 2000).

In Pflanzen enthaltene Bitterstoffe werden von Naturvölkern als Pfeilgift bei der Jagd verwendet. Ouabain, aus den Samen von afrikanischen Schlingpflanzen gewonnen, wirkt besonders schnell und führt zum Herzstillstand der Beute (Santesson, 1928).

Bitterstoffe können bei der Verarbeitung, dem Reifen oder dem Verderben von Nahrungsmitteln durch die Maillard- und Fermentationsreaktionen entstehen (Belitz und Wieser, 1985; DuBois et al., 2008; Hofmann, 2005). In unserer Nahrung kommt eine Vielzahl an Bitterstoffen vor, wobei ein gewisses Maß an Bitterkeit von uns toleriert oder sogar als ansprechend empfunden wird. Getränke wie zum Beispiel Kaffee (Koffein), Bier (Humolone) oder auch Käse (Bitterpeptide) weisen eine bittere Note auf (Chaudhari, 2010; Lindemann, 1996). Die bislang bittersten bekannten Stoffe sind Denatonium und Amarogentin (Saroli, 1984; Belitz und Wieser, 1985). Denatonium ist synthetischen Ursprungs und wird verwendet um das versehentliche Verschlucken, vor allem durch Kinder, von Kosmetikprodukten und Putzmitteln zu verhindern. Auch die Isolierung von Kabeln kann damit versehen werden, um Beschädigungen durch Nager zu vermeiden. Bitterstoffe können auch bei chemischen Synthesen als Zwischen- oder Endprodukt entstehen. So zum Beispiel Caprolactam, welches eine Vorstufe bei der Synthese von Nylon ist.



Abbildung 2: Die ubiquitäre Verbreitung von Bitterstoffen.

Natürlich vorkommende Giftstoffe in Pflanzen (von links nach rechts): Strychnin aus der gewöhnlichen Brechnuss (*Strychnos nox-vomica*) führt zu Krämpfen und Atemnot (Sitte et al., 2002). Amygdalin ist ein cyanogenes Glykosid aus Aprikosenkernen. Nikotin ist in Nachtschattengewächsen wie zum Beispiel *Nicotiana tabacum* enthalten. Ouabain enthalten in afrikanischen Schlingpflanzen (*Strophanthus gratus*) wird von Naturvölkern als Pfeilgift verwendet (Neuwinger, 1998).

In unserer Nahrung enthaltene Bitterstoffe (von links nach rechts): Bitterpeptide im Käse entstehen während der Reifung. Koffein ist einer von vielen im Kaffee enthaltenen bitteren Inhaltsstoffen. Epicatechin kommt in Schokolade vor. Der Bitterstoff Allylisothiocyanat ist zusätzlich für die Schärfe von Senfkörnern verantwortlich.

In der Chemie (von links nach rechts): Denatoniumbenzoat wird als Fraßschutz für Kabel eingesetzt. Phenanthrolin wird in der Komplexchemie als Phenanthrolin-Eisen-Komplex als Redoxindikator verwendet (Blume und Wiechoczek, 1999). Caprolactam entsteht als Zwischenprodukt bei der Nylon 6 Synthese (Pixabay). Ethylthioharnstoff kann als Korrosionsschutz für Metall genutzt werden.

Physiologisch wirksame Bitterstoffe in der Medizin (von links nach rechts): Vernodalin aus *Vernonia amygdalina* ist ein Antibiotikum und wird von Chimpansen zur Selbstmedikation verzerrt (Huffmann, 2005). Chloroquin wird als Medikament zur Behandlung von Malaria eingesetzt (Pixabay). Yohimbin aus der Rinde und den Blättern des Yohimbe-Baums (*Pausinystalia yohimbe*) wird bei Naturvölkern als Aphrodisiakum verwendet (Rätsch, 1990). Cycloheximid wird produziert von dem Bakterium *Streptomyces griseus* (Amano et al., 2002) und als Antibiotikum eingesetzt.

Pflanzliche aber auch synthetische Bitterstoffe finden breite Anwendung in der Medizin und Gesundheitsprodukten. Zu den gesundheitsförderlichen Eigenschaften zählen unter anderem antikanzerogene, antimikrobielle und antioxidative Wirkungen (Barrat-Fornell und Drewnowski, 2002; Gaudette und Pickering, 2013; Homewood et al., 1972). In Tansania konnten Schimpansen beobachtet werden die bei Krankheit eine bittere Pflanze (*Vernonia amygdalina*) fraßen. Wobei die jungen, besonders bitteren Blätter bevorzugt verzehrt wurden. Diese weisen einen besonders hohen Gehalt an dem Sesquiterpenlacton Vernodalin auf, welchem eine antibiotische Wirkung nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich nehmen die Schimpansen die Pflanze zur Selbstmedikation auf (Huffmann und Seifu, 1989; Huffmann, 1997; Koshimizu et al., 1994). Von den Einheimischen werden die Blätter der Pflanze *Vernonia amygdalina* gegen eine Vielzahl von Beschwerden verwendet. So wirken die enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe nachweislich antiparasitär, gegen Durchfall, Übelkeit und anderen Erkrankungen (Farombi und Owoeye, 2011).

1.3 Die Bittergeschmacksrezeptoren

Im Vergleich zu den Aktivatoren der vier anderen Geschmacksarten, besitzen Bitterstoffe die größte chemische Komplexität (Behrens und Meyerhof, 2017c). Von kleinen Molekülen bis hin zu komplexen Proteinen werden Bitterstoffe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der *TAS2R*-Genfamilie (taste receptor family 2) detektiert (Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000). Nach Fredriksson und Kollegen (2003) kann die große Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren nach der evolutionären Entwicklung eingeteilt werden. Die Autoren klassifizierten die Rezeptoren in fünf Hauptgruppen im GRAFS-System (Glutamat-, Rhodopsin-, Adhesion-, frizzled/taste2- und Sekretin-Rezeptoren). In der A bis F-Klassifizierung werden die *TAS2Rs* der Klasse A der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren zugeordnet (Attwood und Findlay, 1994; Adler et al. 2000). Wobei die Rezeptoren sich alle im Aufbau gleichen (Rompler et al., 2007) und die Signaltransduktion über die Aktivierung gekoppelter G-Proteine fungiert (beispielhaft für den Bittergeschmack in Abbildung drei dargestellt).

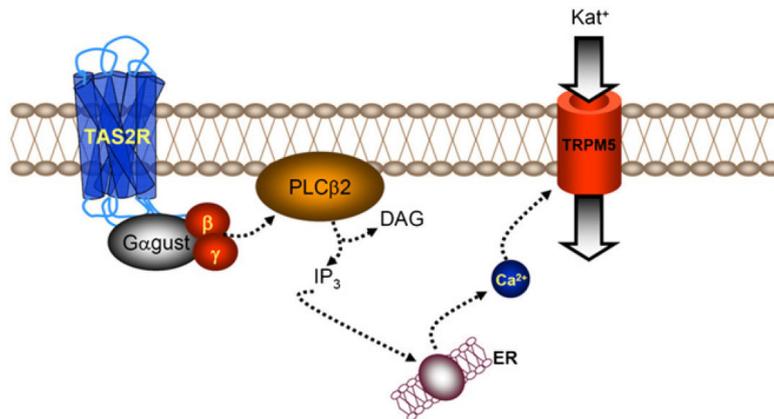


Abbildung 3: Signaltransduktion der Bittergeschmacksrezeptoren (Behrens und Meyerhof, 2011).

Durch die Bindung eines Agonisten an den Bittergeschmacksrezeptor dissoziieren das G-Protein (Gagust) und die G-Protein-Untereinheiten (β und γ). Diese aktivieren die Phospholipase $\beta 2$ (PLC $\beta 2$) wodurch Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP $_3$) gebildet werden. IP $_3$ stimuliert die Ausschüttung von Calcium-Ionen (Ca $^{2+}$) aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER). Aufgrund der erhöhten Calcium-Konzentration im Zytosol kommt es zur Öffnung des *transient-receptor-potential-channel* (TRPM5), welches zum Einstrom von Kationen (Kat $^+$) führt und damit zur Depolarisierung der Sinneszelle.

Die Anzahl der *TAS2R*-Gene innerhalb der Vertebraten variiert stark. So sind beispielsweise im Genom von Hühnern lediglich drei Rezeptorgene kodiert, von denen alle funktional sind. Frösche hingegen besitzen 66 Genloci, wovon 54 für funktionelle Bittergeschmacksrezeptoren kodieren (Behrens et al. 2014), Quastenflosser sogar 80, von denen mindestens 74 für intakte Bittergeschmacksrezeptoren kodieren (Dong et al. 2009; Syed und Korsching, 2014). Die hohe Variabilität der Anzahl der Bitterrezeptorgene könnte auf das Nahrungsspektrum der Spezies zurückzuführen sein. So besitzen Herbivoren, in deren Nahrung Bitterstoffe in einer hohen Anzahl zu finden sind, mehr Bittergeschmacksrezeptorgene als Karnivoren (Li und Zhang, 2014). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass das Agonistenspektrum der einzelnen Bitterrezeptoren stark variieren kann und somit die Nahrungswahl wahrscheinlich nicht der einzige bestimmende Faktor ist (Behrens et al., 2014; Meyerhof et al., 2010a).

Der Mensch besitzt 25 Gene für potenziell funktionale Bittergeschmacksrezeptoren, von denen einige genetische Polymorphismen aufweisen. Für die Bittergeschmacksrezeptoren *TAS2R9*, -R16, -R31, -R38 und -R43 sind jeweils mehr als eine funktionelle Variante bekannt (Bufe et al., 2005; Dotson et al., 2008; Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011; Soranzo et al., 2005). Die Wahrnehmung von Bitterstoffen kann daher, abhängig von der komplexen genetischen Verknüpfung der Bittergeschmacksrezeptorvarianten (Roudnitzky et al., 2015), individuell unterschiedlich sein. Abhängig von der genetischen Disposition der Bittergeschmacksrezeptoren können manche Bitterstoffe gar nicht oder nur mit einem erhöhten Schwellwert

detektiert werden, wodurch geschmackliche Präferenzen entstehen können (Chaudhari und Roper, 2010; Roudnitzky et al., 2011). Zum Beispiel befähigt die Genvariante TAS2R38-PAV dazu, Propylthiouracil (PROP) und Phenylthiocarbamid (PTC) zu schmecken, wo hingegen Genträger der homozygoten Variante TAS2R38-AVI diese Substanzen kaum oder erst in vielfach höheren Konzentrationen als bitter wahrnehmen (Bufe et al., 2005). Beide Merkmalsausprägungen sind in der Bevölkerung weit verbreitet, wobei keine Häufung einer der beiden Genvarianten festgestellt werden konnte (Bufe et al., 2005; Wooding et al., 2004). Des Weiteren wurden auch für andere Rezeptoren genetische Variationen gefunden, welche die individuelle Geschmackspräferenz beeinflussen, bzw. könnten Variationen in der Anzahl der Genkopien eine Rolle spielen (Hayes et al., 2011; Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2015; Roudnitzky et al., 2016). Nach einer Untersuchung von Behrens und Kollegen (2007) werden alle 25 *TAS2R* Gene mit unterschiedlicher Frequenz und Expressionsstärke in den Bittergeschmacksrezeptorzellen exprimiert, wobei in einer Rezeptorzelle vier bis elf unterschiedliche *TAS2R* koexprimiert werden (Behrens et al., 2007; Behrens et al., 2017b). Eine Abhängigkeit von Bitterkeit und Toxizität konnte bisher wissenschaftlich nicht eindeutig nachgewiesen werden (Glendinning, 1994; Behrens und Meyerhof, 2017b).

Bittergeschmacksrezeptoren gehören zu den Glykoproteinen (Reichling et al., 2008) und können Homo- und Heterooligomere bilden (Kuhn et al., 2010). Jedoch konnten bis jetzt alle Aktivierungen der *TAS2R* (*in vitro*) nur mono- oder homodimeren Rezeptoren zugeschrieben werden (Behrens und Meyerhof, 2018b). Die Rezeptoren sind aufgebaut aus sieben Transmembrandomänen, welche durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbunden sind. Dabei liegt der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus im intrazellulären Bereich (Floriano et al., 2006; Miguet et al., 2006). Für die Aktivierung des Rezeptors ist der Aufbau der Bindungstasche von entscheidender Bedeutung (Brockhoff et al., 2010; Pronin et al., 2004; Sandal et al., 2015).

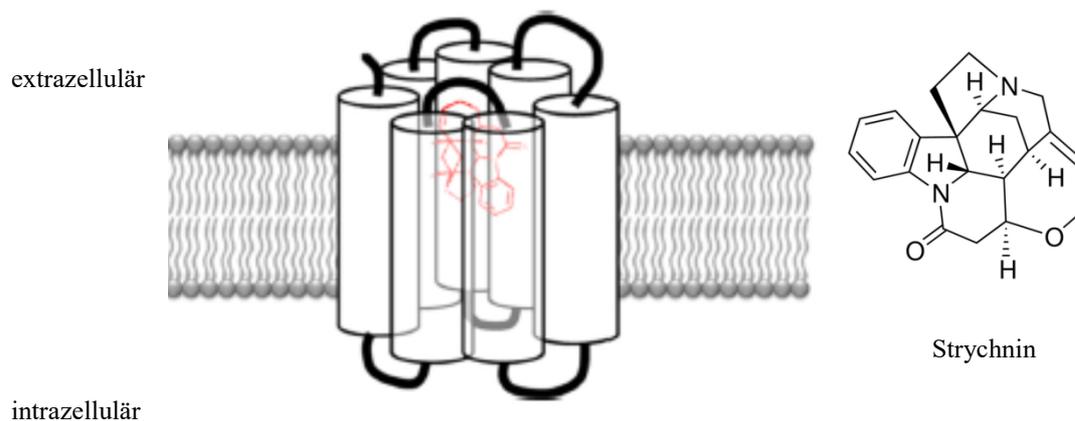


Abbildung 4: Darstellung eines Bittergeschmacksrezeptors (modifiziert nach Behrens et al., 2018b).

Dieser besteht aus sieben Transmembrandomänen (Zylinder) und jeweils drei extra- und intrazellulären Schleifen. Im oberen Bereich des Rezeptors liegt die Bindungstasche, hier gezeigt mit dem gebundenen Agonisten Strychnin (rot).

Bitterrezeptoren besitzen eine orthosterische Bindungstasche, in welcher die Agonisten individuelle Kontaktpunkte besitzen. Diese können teilweise überlappen (Brockhoff et al., 2010). Nach einer Studie von Born und Kollegen (2013) befinden sich in der Bindungstasche des TAS2R10 mehrere Aminosäurereste, welche hoch selektiv für einzelne Agonisten sind. Den Autoren zufolge ist dieser Rezeptor auf das Erkennen von vielen chemisch diversen Agonisten ausgerichtet, allerdings zu Ungunsten der Affinität (Born et al., 2013). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Bindungsstellen für gleiche Bittersubstanzen in verschiedenen Rezeptoren nicht zwangsläufig konserviert sind, sondern sich unabhängig voneinander ausgebildet haben (Born et al., 2013; Behrens und Meyerhof, 2018b). Die Agonisten können TAS2Rs *in vitro* vom nanomolaren bis zum millimolaren Konzentrationsbereich aktivieren und schon kleinste Änderungen der Molekülstruktur der Agonisten können zu unterschiedlichen Detektionsschwellen führen (Behrens und Meyerhof, 2016; Meyerhof et al., 2010b).

In einer umfassenden Charakterisierung der humanen Bitterrezeptoren konnten Meyerhof und Kollegen (2010a) aufklären, wie es für nur 25 Bittergeschmacksrezeptoren möglich ist, die große Anzahl chemisch höchst unterschiedlicher Stoffe zu detektieren. In der Studie wurden 104 -als bitter schmeckend bekannte Substanzen- als Agonisten für alle 25 TAS2Rs getestet. Hierbei bestand die Substanzbibliothek aus 58 natürlich vorkommenden und 46 synthetischen Stoffen. Mittels heterologer Expression der Bittergeschmacksrezeptoren in einer humanen Zelllinie wurde deren Reaktion auf die Bitterstoffe via funktionellen Calcium-Messungen

analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass jeder der bis dato 20 deorphanisierten TAS2R ein individuelles Agonistenspektrum besitzt. Fünf der funktionellen Bitterrezeptoren konnten auch in dieser Studie nicht deorphanisiert werden, allerdings wurde von der gleichen Arbeitsgruppe im Jahr 2013 dem TAS2R41 Chloramphenicol als Agonist zugeordnet (Thalmann et al., 2013). Die Autoren ordneten die Rezeptoren anhand des Agonistenspektrums in vier Gruppen ein. Zum einen die Gruppe der Rezeptoren TAS2R16 und -38, unter deren Agonisten viele eine gemeinsame funktionelle Gruppe aufweisen. TAS2R38 erkennt bevorzugt auf Liganden mit einem NCS-Motiv, TAS2R16 erkennt unter anderem β -Glukopyranoside. Allerdings aktivierten auch wenige Substanzen ohne diese chemischen Eigenschaften die Rezeptoren.

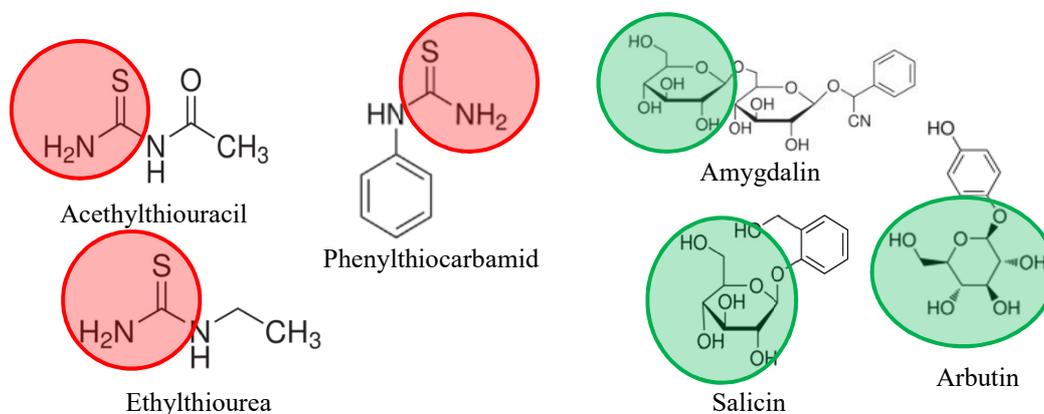


Abbildung 5: Beispiele für Agonisten des TAS2R38 (links) und des TAS2R16 (rechts).

Die gemeinsamen funktionellen Gruppen sind markiert (NCS-Motiv (rot) und β -Glukopyranosid (grün)).

Die zweite Gruppe umfasst die Rezeptoren TAS2R3, -R5, -R8, -R13, -R20 und -R50, welche mit ein bis drei Agonisten ein begrenztes Agonistenspektrum besitzen. Die Autoren der Studie konnten mögliche gemeinsame funktionelle Gruppen der Liganden identifizieren, zum Beispiel Carbonylgruppen für die Agonisten des TAS2R8 oder aliphatische Ringe für TAS2R50. Der Rezeptor TAS2R9 kann in diese Gruppe eingeordnet werden, da auch dieser drei Agonisten besitzt (Dotson et al., 2008). Die dritte Gruppe (TAS2R1, -R4, -R7, -R30, -R31, -R39, -R40, -R43) besteht aus Rezeptoren, die auf sechs bis 16 Bittersubstanzen reagierten, bei denen sich allerdings keine allgemeinen gemeinsamen chemischen Merkmale erkennen lassen. Die vierte Gruppe besteht aus Rezeptoren (TAS2R10, -R14 und -R46), die von 28 und mehr Substanzen – also einem Drittel der Testsubstanzen – aktiviert wurden und somit ein ausgesprochen weites Agonistenspektrum aufweisen. Auch hier sind die Bitterstoffe chemisch sehr divers ohne allgemeine gemeinsame Eigenschaften. Des Weiteren zeigte die Studie, dass viele der Bitterstoffe nicht nur einen Rezeptor aktivieren. In Abbildung 6 ist zu sehen, dass zwar 32 von den 104 Testsubstanzen jeweils nur einen TAS2R aktivieren, aber auch

dass 42 Stoffe zwei bis fünf Rezeptoren und sieben Substanzen sechs bis neun TAS2R aktivieren. Wie sich herausstellte ist die Bittersubstanz Diphenidol ein Agonist von sogar 15 TAS2Rs.

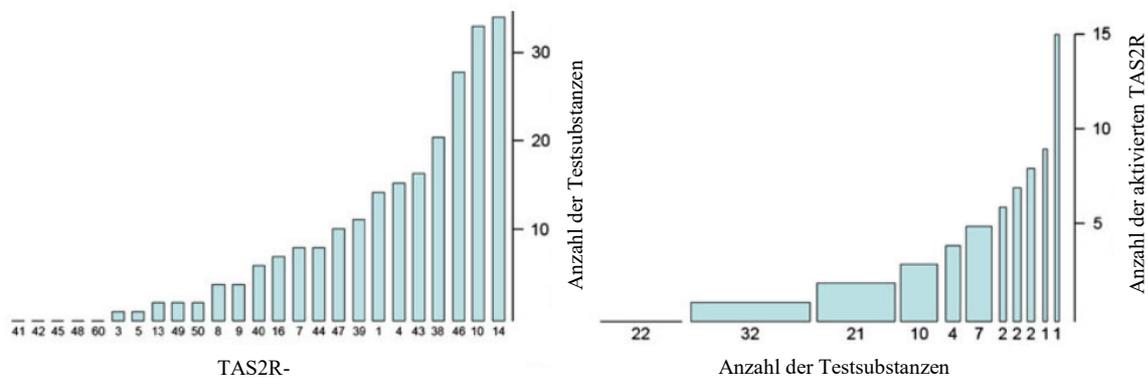


Abbildung 6: Agonistenspektrum der humanen Bitterrezeptoren (modifiziert nach Meyerhof et al., 2010a).

Der Graph links zeigt die Summe der Substanzen (aus der 104 Stoffe umfassenden Substanzbibliothek), welche den jeweiligen TAS2R aktivieren. Der rechte Graph schlüsselt die Studie nach dem Rezeptorenspektrum der Bitterstoffe auf. Hier wird die Summe der aktivierten Rezeptoren der Substanzen dargestellt.

Ein weiterer Aspekt der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung ist das Vorkommen von TAS2Rs außerhalb des Mund- und Rachenraums. So konnte die Expression im Gastrointestinaltrakt (Behrens und Meyerhof, 2011), in den Atemwegen (Shah et al., 2009), im Herzen (Foster et al., 2013), im Gehirn (Singh et al., 2011) und weiteren Geweben nachgewiesen werden (Behrens und Meyerhof, 2017b). Noch sind nicht alle physiologischen Funktionen der Bittergeschmacksrezeptoren im nicht-oralen Gewebe geklärt (Behrens und Meyerhof, 2017b). Allerdings konnte in einer Studie von Liszt und Kollegen (2017) nachgewiesen werden, dass Bittergeschmacksrezeptoren im Magen zur Regulierung der Magensäureausschüttung beitragen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Kinder mit schwerem nicht heilbarem Asthma eine erhöhte Expression von mehreren TAS2R-Genen aufweisen (Orsmark-Pietras et al., 2013). Auch weitere Studien deuten auf wichtige physiologische Regulationsmechanismen der TAS2R hin (Deshpande et al., 2010; Finger et al., 2003; Malki et al., 2015; Shah et al., 2009). Im Hinblick darauf könnten Antagonisten der Bittergeschmacksrezeptoren als pharmakologische Wirkstoffe eingesetzt werden. Bereits jetzt finden Antagonisten für andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren breite Anwendung in der Behandlung von Krankheiten. Mit mehr als 800 bekannten Rezeptoren sind diese an der Regulation einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt (Hauser et al., 2017) und stellen damit wichtige pharmakologische Ziele dar. So werden deren Antagonisten bei der Therapie von Psychosen, Parkinson, Asthma und vielem mehr eingesetzt (Tyndall und Sandilya, 2005; Congreve et al.,

2011). Das Medikament Maraviroc wirkt antagonistisch auf den Chemokinrezeptor CCR5 und verhindert das Eindringen des HIV-1 Subtyps (*human immunodeficiency virus*) in die Wirtszellen (Perry, 2010), um nur eins von vielen Beispielen zu nennen. Weit über 400 Medikamente wirken auf GPC-Rezeptoren und über 300 befinden sich in der Entwicklungsphase (Hauser et al., 2017).

1.4 Inhibitoren des Bittergeschmacks

In der heutigen Lebenssituation der Industrieländer steigt die Anzahl der übergewichtigen Menschen (WHO, 2016). Dafür verantwortlich wird unter anderem eine zu geringe Aufnahme von Obst und Gemüse gemacht, welches wiederum mit einem erhöhten Risiko an Diabetes und koronaren Herzleiden zu erkranken assoziiert wird (Ford und Mokdad, 2001; He et al., 2004; Hung et al., 2004; Riboli und Norat, 2003). Für eine Ernährung, die wenig Obst und Gemüse beinhaltet könnte der Bittergeschmack verantwortlich sein, da diese Bitterstoffe, wie zum Beispiel sekundäre Pflanzenstoffe, enthalten können (Tepper, 1998). Allerdings werden sekundären Pflanzenstoffen wie Phenolen, Flavonoiden, Isoflavonoiden, Terpenen und Glucosinolaten, antioxidative und antikanzerogene Eigenschaften zugeschrieben (Beecher, 1999; Craig, 1997). Pflanzliche Inhaltsstoffe mit einem nachgewiesenen positiven Effekt auf die Gesundheit sind besonders für die Nahrungsmittelindustrie zur Herstellung von sogenanntem „functional food“ interessant. Diese Nahrungsmittel werden mit gesundheitsförderlichen Inhaltsstoffen versehen, wie den eben genannten sekundären Pflanzenstoffen aber auch Vitaminen und Mineralstoffen (Klaenhammer, 2000). „Functional food“ ist der am schnellsten wachsende Sektor der Nahrungsmittelindustrie und der Geschmack dieser Produkte ist von entscheidender Bedeutung für die Verbraucherakzeptanz (Verbeke, 2006). Somit wäre es von Vorteil einen eventuell auftretenden Bittergeschmack der gesunden Inhaltsstoffe zu maskieren. Auch bei Medikamenten führt der Bittergeschmack vieler Wirkstoffe zu ablehnenden Verhalten der Patienten. Tabletten können mit Polymeren überzogen werden um den Geschmack zu überdecken (Sohi et al., 2004). Patienten mit Schwierigkeiten beim Schlucken von Tabletten, insbesondere Kinder und ältere Menschen, wird als Alternative oft Saft verabreicht (Shet und Vaidya, 2013). Bei diesem ist es allerdings weitaus schwieriger bittere Noten zu reduzieren (Ley, 2008).

Die Industrie verwendet mehrere Methoden, um den Bittergeschmack zu maskieren. Dafür können süß schmeckende Substanzen, Salze aber auch Geruchsstoffe und die Änderung der Konsistenz des Lebensmittels verwendet werden (Breslin und Beauchamp, 1995; Calvino et

al., 1993; Delwiche, 2004; Keast und Breslin 2002; Keast et al., 2004). Allerdings können Geruchsstoffe und Konsistenz den Bittergeschmack nur bedingt überdecken. Des Weiteren steht der Verbraucher künstlichen Süßstoffen eher kritisch gegenüber und auch natürlicher Zucker ist aufgrund seines hohen Kaloriengehalts als Zusatzstoff für „functional food“ eher problematisch (Ley, 2008). Eine weitere Möglichkeit stellt das Einkapseln der Bitterstoffe dar. Zum Beispiel werden β -Cyclodextrine (zyklische Oligosaccharide) in Getränken dazu verwendet, den Bittergeschmack von Naringin und Limonin zu inhibieren (Szente und Szejtli, 2004). Bei dem Einsatz von Cyclodextrinen muss jedoch darauf geachtet werden, dass diese selbst in höheren Konzentrationen süß schmecken und auch andere Geschmacksstoffe einkapseln können, und sich so das Geschmacksprofil eines Produktes unerwünscht ändern kann (Astray et al., 2009; Binello et al. 2004).

Auch der Verzehr von stark zuckerhaltigen Getränken, wie zum Beispiel Limonaden und Fruchtsäften, wird mit Übergewicht und den daraus resultierenden Krankheiten in Verbindung gebracht (Malik et al., 2006). Durch Zuckerersatzstoffe, wie zum Beispiel Saccharin und Acesulfam K, kann der Kaloriengehalt von Nahrungsmitteln und Getränken stark gesenkt werden (Schiffmann und Gatlin, 1993). Allerdings können diese nur bis zu einem bestimmten Grad verwendet werden, da sie in hohen Konzentrationen einen bitteren Nachgeschmack aufweisen und nachweislich Bitterrezeptoren aktivieren (Horne et al., 2002; Kuhn et al., 2004; Schiffmann et al., 1995).

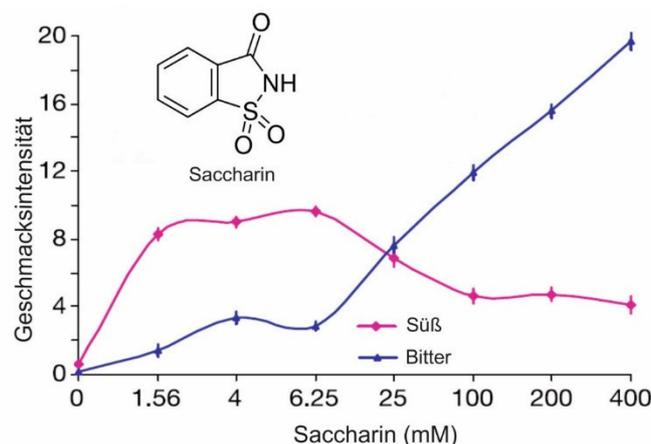


Abbildung 7: Geschmacksintensität des Süßstoffes Saccharin (modifiziert nach Galindo et al., 2006).

Gezeigt wird der konzentrationsabhängige Anstieg der wahrgenommenen Bitterkeit des Zuckerersatzstoffes.

Süßstoffe finden auch Anwendung in Medikamenten, um deren Akzeptanz, vor allem bei kleinen Kindern und älteren Patienten, zu erhöhen und zudem nicht kariogen sind (Ley, 2008; Shet und Vaidya, 2013).

Um den Bittergeschmack von Medikamenten, gesunden Lebensmitteln und Getränken gezielt inhibieren zu können, wären spezifisch wirksame Bitterantagonisten von großem Nutzen. So suchten Slack und Kollegen (2010) im Hochdurchsatzverfahren nach Antagonisten für Bittergeschmacksrezeptoren. Mit Hilfe von funktionellen Calciummessungen fanden die Autoren heraus, dass die Substanz GIV3727 (4-(2,2,3-trimethylcyclopentyl)-Buttersäure) ein Inhibitor für TAS2R31 und -R43 ist. Die Rezeptoren wurden mit Saccharin und Acesulfam K aktiviert, nach Zugabe von GIV3727 konnte eine Reduktion der Rezeptorantwort beobachtet werden und auch in sensorischen Studien konnte die Wirksamkeit von GIV3727 belegt werden. Interessanterweise wurden auch vier weitere Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R4, -R7, -R20, -R40) von GIV3727 inhibiert (Slack et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die Wahrnehmung des Bittergeschmacks direkt auf Rezeptorebene moduliert werden kann.

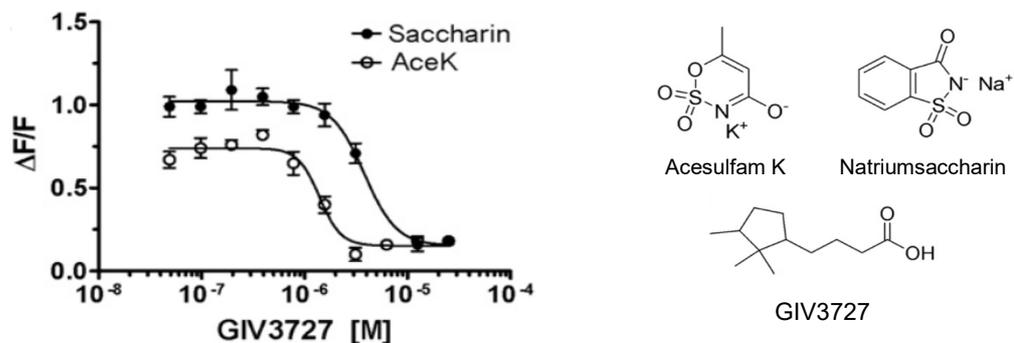


Abbildung 8: Inhibition des TAS2R31 durch GIV3727 (modifiziert nach Slack et al., 2010).

Gezeigt ist das Aktivitätsmuster des TAS2R31 gemessen durch funktionelle Calciumanalysen. Der Rezeptor wurde aktiviert durch die Agonisten Saccharin (gefüllte Kreise) und Acesulfam K (offene Kreise), um dann durch steigende Konzentrationen des Antagonisten GIV3727 inhibiert zu werden.

In den folgenden Jahren wurden weitere Antagonisten der TAS2Rs gefunden und durch *in vitro* Experimente konnte deren Wirkung auf Rezeptorebene nachgewiesen werden. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die bis jetzt gefundenen Bittergeschmacksinhibitoren, welche als Antagonisten für einen oder mehrere TAS2Rs fungieren.

Tabelle 1: Antagonisten des Bittergeschmacks, ihre Rezeptoren und die Agonisten, bei denen die Rezeptorantwort reduziert ist.

Antagonist	TAS2R	Agonist	Quelle
Natriumcyclamat	3 7 9 31 41 43	Chloroquin Chlorpheniramin Pirenzepin Natriumsaccharin, Aristolochiasäure Chloramphenicol Natriumsaccharin, Aristolochiasäure	Behrens et al., 2017a
Natriumsaccharin	1 3 7 9 41	Amarogentin, Natriumcyclamat Chloroquin Chlorpheniramin Pirenzepin Chloramphenicol	Behrens et al., 2017a
3 β -Hydroxydihydrocostunolide	30 40 46	Brucin Cohumolon Absinthin, Andrographolid, Denatoniumbenzoat, Picrotroxinin, Strychnin	Brockhoff et al., 2011
3 β -Hydroxypelenolide	30 31 46	Brucin Aristolochiasäure Absinthin, Andrographolid, Picrotroxinin (partieller Agonist)	Brockhoff et al., 2011
6-Methoxysakuranetin	31	Natriumsaccharin	Fletcher et al., 2011
Jacoesidin	31	Natriumsaccharin	Fletcher et al., 2011
Sakuranetin	31	Natriumsaccharin	Fletcher et al., 2011
Probenecid	16 38 43	Salicin Phenylthiocarbamid, 6-Propyl-2-Thiouracil Aloin	Greene et al., 2011
Peptid Asp-Glu-Ser	16	Salicin	Kim et al., 2015
Peptid Glu-Asp	16	Salicin	Kim et al., 2015

Antagonist	TAS2R	Agonist	Quelle
Peptid Glu-Glu	16	Salicin	Kim et al., 2015
Peptid Glu-Gly-Ser	16	Salicin	Kim et al., 2015
Peptid Glu-Ser	16	Salicin	Kim et al., 2015
Abscisinsäure	4	Chinin	Pydi et al., 2015
γ -Aminobuttersäure	4	Chinin	Pydi et al., 2014
N α ,N α -bis-(Carboxymethyl)-L-Lysin	4	Chinin	Pydi et al., 2014
6,3'-Dimethoxyflavanon	14 39	Epicatechingallat, Genistein Epicatechingallat, Denatoniumbenzoat	Roland et al., 2014
4'-Fluoro-6-Methoxyflavanon	14 39	Epicatechingallat, Genistein Epicatechingallat, Denatoniumbenzoat	Roland et al., 2014
6-Methoxyflavanon	14 39	Epicatechingallat Genistein Epicatechingallat, Denatoniumbenzoat	Roland et al., 2014
GIV3727 4-(2,2,3-Trimethylcyclopentyl) Buttersäure	4 7, 20 31 40 43	Colchicin Cromolyn Aristolochiasäure, Saccharin, Acesulfam K Cohumolon Aristolochiasäure	Slack et al., 2010
(R)-Citronellal	43 46	Koffein, Aristolochiasäure, Denatoniumbenzoat, Helicin, Saccharin Koffein	Suess et al., 2016
3-Methylhexanal	43	Koffein	Suess et al., 2016

Im Jahr 2007 konnte in einer umfangreichen Studie zum Agonistenspektrum von TAS2R46 gezeigt werden, dass dieser Bittergeschmacksrezeptor eine Vielzahl von Sesquiterpenlactonen erkennt. Des Weiteren fanden die Autoren Substanzen, welche eine sehr große Strukturverwandtheit zu Agonisten des TAS2R46 aufwiesen, diesen allerdings nicht aktivierten (Brockhoff et al., 2007). Diese Sesquiterpenlactone wurden in darauffolgenden Experimenten weiter untersucht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit wurde angenommen, dass die Substanzen zwar nicht zu einer Aktivierung des TAS2R46 führen aber in die Bindungstasche des Rezeptors passen könnten, somit die Bindungstasche für Agonisten unzugänglich machen und als Antagonisten fungieren könnten (Brockhoff et al., 2011). Tatsächlich stellte sich die Annahme für zwei Substanzen als richtig heraus, namentlich 3 β -Hydroxydihydrocostunolid (3HDC) und 3 β -Hydroxypelenolid (3HP). Diese Sesquiterpenlactone unterscheiden sich strukturell von dem Agonisten Costunolid hauptsächlich in einer 3 β -Hydroxygruppe. Durch die simultane Applikation von Agonist und potentiellen Antagonist in einem zellbasierten Rezeptorassay konnte die antagonistische Wirkung der Substanzen untersucht werden.

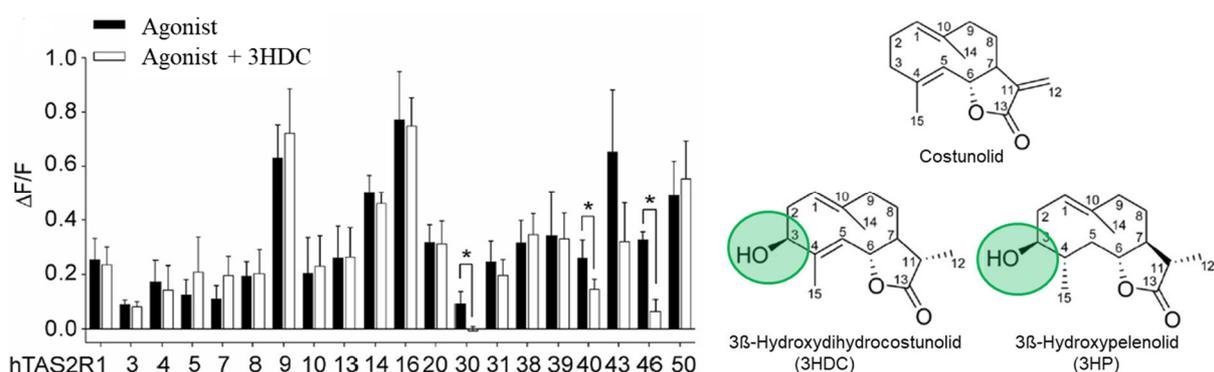


Abbildung 9: Aktivitätsmuster von 3HDC (modifiziert nach Brockhoff et al., 2011).

Im Graph sind alle getesteten TAS2Rs zu sehen. Um den antagonistischen Effekt von 3HDC nachzuweisen wurde die Höhe des Rezeptorsignals (relative Fluoreszenz im Rezeptorassay) verglichen: die Rezeptorantwort mit der alleinigen Applikation des Agonisten (schwarze Balken) gegen die Rezeptorantwort mit der simultanen Applikation von Agonist und 3HDC (weiße Balken). Links abgebildet sind die chemischen Strukturen von Costunolid (Agonist des TAS2R46), 3HDC (Antagonist des TAS2R46) und 3HP (partieller Agonist des TAS2R46). Markiert ist die 3 β -Hydroxygruppe.

Es konnte gezeigt werden, dass 3HDC nicht nur den Rezeptor TAS2R46 mit unterschiedlichen Agonisten vollständig inhibierte, sondern auch bei zwei weiteren TAS2Rs die Rezeptorantwort vermindert. 3HP konnte als Antagonist von TAS2R30 und -R31 verifiziert werden. Das Rezeptorsignal von TAS2R46 hingegen wurde durch 3HP verringert und wahrscheinlich ist diese Substanz ein partieller Agonist des TAS2R46. Partielle Agonisten zeigen meist nur ein

diese Substanz ein partieller Agonist des TAS2R46. Partielle Agonisten zeigen meist nur ein marginales Rezeptorsignal, da sie aber mit vollen Agonisten um die Bindungsstelle des Rezeptors konkurrieren führt dies bei simultaner Applikation zu einer Reduktion des Signals. Interessanterweise kommen alle drei Substanzen (Costunolid, 3HDC und 3HP) in Wermut vor, einer Pflanze mit sehr starkem Bittergeschmack.

Des Weiteren aktivieren beide Substanzen eine Teilgruppe von TAS2Rs. 3HDC konnte als Agonist von TAS2R1, -R4, -R7, -R8, -R10 und -R14 identifiziert werden. 3HP ist ein Agonist von TAS2R10 und -R14.

So zeigte sich in dieser Studie eine bis dahin nicht bekannte Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung. Natürlich vorkommende Bittersubstanzen, welche in einer Pflanze gleichzeitig als Inhaltsstoffe vorkommen, können eine Gruppe von Bittergeschmacksrezeptoren sowohl aktivieren, als auch eine andere Gruppe inhibieren. Weiterhin können sich die Teilgruppen der Rezeptoren überlappen. Zum Beispiel wird der TAS2R30 von 3HDC und 3HP inhibiert. Gleichzeitig sind beide Substanzen Agonisten der Rezeptoren TAS2R10 und -R14.

1.5 Zielstellung

Bitterstoffe können den unterschiedlichsten chemischen Klassen angehören, wie zum Beispiel Metallionen, Flavonoide, Peptide und vielen mehr (Barratt-Fornell et al., 2002; Belitz und Wieser, 1985; Meyerhof, 2005). Die Wahrnehmung der Bitterstoffe erfolgt beim Menschen über 25 Bittergeschmacksstoffrezeptoren (TAS2Rs). Diese weisen ein unterschiedliches Agonistenspektrum auf. Zum einem gibt es Rezeptoren mit wenigen bisher bekannten Agonisten, zum anderen weisen vor allem TAS2R10, -R14 und -R46 ein besonders breit gefächertes Agonistenspektrum auf (Meyerhof et al., 2010a). Es konnte gezeigt werden, dass viele Bitterstoffe mehr als einen TAS2R aktivieren können. Des Weiteren wurden zwei Sesquiterpenlactone gefunden, welche sowohl als Agonisten als auch als Antagonisten von verschiedenen Bittergeschmacksrezeptoren fungieren (Brockhoff et al., 2011).

Hemmstoffe des Bittergeschmacks könnten die Verbraucherakzeptanz von Medikamenten und gesunden Nahrungsmitteln, welche eine bittere Note aufweisen, verbessern. Ferner könnten Antagonisten als Werkzeug für die weitere Erforschung der TAS2Rs dienen.

Ziel dieser Arbeit war es die Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung zu untersuchen und neue Antagonisten der Bittergeschmacksrezeptoren zu identifizieren und zu charakterisieren. Untersucht werden sollte wie weit verbreitet das Prinzip ist, indem eine Substanz gleichzeitig aktivierend und inhibierend auf unterschiedliche Teilmengen von Bittergeschmacksstoffrezeptoren wirkt. Mittels funktionellen Calciumanalysen sollten 52 Bitterstoffe auf acht ausgewählte TAS2Rs als Antagonisten getestet werden. Weiterhin sollte eine Substanz auf alle 21 deorphanisierten TAS2Rs auf ihr antagonistisches Potential untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geschmacksstoffe

Alle in der Arbeit verwendeten Geschmacksstoffe wurden im höchsten Reinheitsgrad von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D) bezogen. Nur Cucurbitacin E wurde von Apin Chemicals (Abingdon, England) und Solanidin von Abcr GmbH (Karlsruhe, D) bezogen. Hardwickische Säure wurde von Givaudan (Vernier, Schweiz) bereitgestellt.

2.1.2 Enzyme und Kits

Die Enzyme zur Restriktionsanalyse wurden von Fermentas (St. Leon Roth, D) bezogen. Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte über Silikatmembranen mit dem „NucleoBond PC Kit“ (Midi/Maxipräparation) von Macherey-Nagel (Düren, D).

2.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle benötigten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden geordert bei den Firmen Brand (Wertheim, D), Biochrom (Berlin, D), Bioline (Luckenwalde, D), Biozym (Oldendorf, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Eppendorf (Hamburg, D), Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D), Fermentas (St. Leon Roth, D), Greiner (Solingen, D), Invitrogen (Karlsruhe, D), Macherey-Nagel (Düren, D), Merck (Darmstadt, D), Molecular Probes (Eugene, USA), Qiagen (Hilden, D), TPP (Trasadingen, Schweiz), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA), Sarstedt (Nümbrecht, D), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D), Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) und VWR (Darmstadt, D). Zur standardmäßigen Ausstattung eines molekularbiologischen Labors gehörende Geräte und Verbrauchsmaterialien werden nicht im Detail aufgeführt.

2.1.4 Geräte

Alle in der Arbeit verwendeten Geräte sind im Folgenden mit dem Hersteller aufgeführt.

Tabelle 2: Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Analysewaage R180D	Sartorius, Göttingen, D
Elektrophoresekammer Horizon 58	Biometra, Göttingen, D
FLIPR Tetra	Molecular Devices, München, D
Geldokumentation Gene Genius	Syngene, Cambridge, UK
Inkubator HeraCell	Heraeus, Hanau, D
Magnetrührer Ikamag RET	IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikroskop Telaval31	Zeiss, Oberkochen, D
pH-Meter Hi 221	Hanna Instruments, Vöhringen, D
Plattenwaschgerät ELx50	Biotek, Winooski, USA
Präzisionswaage Acculab	Sartorius, Göttingen, D
Spannungsquelle PowerPac 3000	Biorad, München, D
Spectrometer Colibri	Titertek Berthold, Pforzheim, D
Sterilwerkbank Antares	Anthos Mikrosystem, Krefeld, D
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad 1083	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge J2-Mi	Beckmann, Krefeld, D

2.1.5 Datenbanken und Computerprogramme

Die Onlinedatenbanken PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) und ChemSpider (<http://www.chemspider.com>) wurden verwendet zur Recherche von Substanzeigenschaften. Die chemischen Strukturen wurden den Herstellern oder PubChem entnommen.

In Tabelle drei sind die zur Datenanalyse und Bearbeitung genutzten Programme aufgelistet.

Tabelle 3: verwendete Computerprogramme

Programm	Hersteller
Contig Express	Invitrogen, Karlsruhe, D
CorelDraw X3	Corel Corporation, Fremont, USA
Endnote X7.7.1	Thomson Reuters, Carlsbad, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
Screen Works 3.1.14	Molecular Devices, München, D
Sigma Plot 12.3	Systat Software, Erkrath, D
Vector NTI Advance 11.5.2	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.6 TAS2R-Haplotypen

Humane Bittergeschmacksrezeptoren weisen genetische Polymorphismen auf, wobei für einige TAS2Rs mehrere funktionelle Varianten bekannt sind (Bufe et al., 2005; Dotson et al., 2008; Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011; Soranzo et al., 2005). Aufgrund dessen sind die in der Arbeit verwendeten Rezeptorvarianten in Tabelle vier aufgelistet mit der Vergleichssequenz und den eventuell abweichenden Nukleotidpositionen.

Tabelle 4: verwendete TAS2R-Haplotypen

TAS2R-	Datenbankeintrag	Nukleotidposition	Aminosäureposition
1	NM_019599.2		
3	NM_016943.2		
4	NM_016944.1		
5	NM_018980.2		
7	NM_023919.2		
8	NM_023918.1		
9	NM_023917.2	T 560 C	V 187 A
10	NM_023921.1	C 467 T	T 156 M
13	NM_023920.2	A 776 G	N 259 S
14	NM_023922.1		
16	NM_016945.2	G 665 A	R 222 H
20	NM_176889.2	A 235 G	K 79 E
30	NM_001097643.1		
31	NM_176885.2	T 484 A	L 162 M
38	NM_176817.4	G 145 C T 785 C	A 49 P V 262 A

TAS2R-	Datenbankeintrag	Nukleotidposition	Aminosäureposition
		A 886 G	I 296 V
39	NM_176881.2		
40	NM_176882.1	T 309 C	F 103 F
41	NM_176883.2	G 189 A	T 63 T
		C 380 T	P 127 L
		G 885 A	S 295 S
43	NM_176884.2	G 104 C	W 35 S
		A 635 G	H 212 R
		C 663 G	T 221 T
46	NM_176887.2	T 108 C	F 37 F
50	NM_176890.2	G 608 A	C 203 Y
		G 777 A	P 259 P

2.1.7 Plasmide

Der Großteil der TAS2Rs lag in dem Vektor pcDNA5/FRT/PM vor, ausgehend von dem Expressionsvektor pcDNA5/FRT von Invitrogen (Karlsruhe, D). Dieser wurde von Bernd Bufe modifiziert, indem durch eine Punktmutation eine von 2 EcoRI-Schnittstellen zerstört wurde. Dies erlaubt die Verwendung der einzigen intakten EcoRI-Schnittstelle in der MCS für Klonierungszwecke.

Die Rezeptoren TAS2R9 und -R41 lagen im Vektor pEAK10 (Edge BioSystems, Gaithersburg, USA) vor, der von Thomas Koch (Magdeburg) bereitgestellt wurde. Beide Vektoren besitzen ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion der transformierten Bakterien. Um die Lokalisation in der Plasmamembran zu verbessern wurde ein SST-Tag in die „Multiple Cloning Site“ integriert. Dieses besteht aus 45 Aminosäuren des N-Terminus des Somatostatinrezeptors Subtyp 3 der Ratte (Ammon et al., 2002; Bufe et al. 2002).

2.1.8 Primer

Die Primer zur Sequenzierung der TAS2Rs wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen (Qualität „high purity salt free“).

Tabelle 5: Primer und deren Sequenz

Primer	Sequenz 5´-3´
BGH	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
CMV	TAGAAGGCACAGTCGAGG

2.1.9 Humane Zelllinie

Für die funktionelle Charakterisierung der TAS2Rs wurden humane embryonale Nierenzellen HEK 293T verwendet, welche das chimäre G-Protein $G_{\alpha 16Gust44}$ stabil exprimieren (Ueda et al., 2003). Diese wurden zur Verfügung gestellt von Jay Slack (Givaudan Flavors Corporation).

2.1.10 Nährmedien für HEK 293T

Zur Kultivierung der HEK 293T $G_{\alpha 16Gust44}$ Zellen wurde Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose von Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet, welches mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (v/v) von Biochrom (Berlin, D), jeweils 1 % Penicillin/ Streptomycin (v/v) (10g/ml, Biochrom, Berlin, D) und 1 % L-Glutamin (v/v) (200 mM, Biochrom, Berlin, D) versetzt wurde. Im Weiteren als DMEM+FCS bezeichnet. Die Selektion des G-Protein $G_{\alpha 16Gust44}$ erfolgte über das Antibiotikum G418 (100 mg/ μ l) von Merck (Darmstadt, D). Zur Transfektion wurde DMEM Glutamax mit 1 g/l Glukose von Invitrogen (Karlsruhe, D) verwendet. Gelagert wurden die Medien bei 4°C.

2.1.11 Bakterienstämme

Zur Retransformation der Plasmide wurden chemisch kompetente „Alpha-Select-Bronze-Efficiency“ Escherichia coli (E. coli) Zellen von Bionline (Luckenwalde, D) verwendet, welche nach Herstellerangabe eine Transformationseffizienz von 1×10^7 cfu/ μ g besitzen.

2.1.12 Nährmedien für Bakterien

Zur Anzucht der E.coli-Zellen wurden LB-Medium bzw. LB-Agarplatten verwendet. Bei langsam wachsenden Konstrukten wurde ein Gemisch aus LB- und TY-Medium (1:2) hergestellt.

LB-Medium

10 g Select Pepton
5 g Hefeextrakt
10 g Natriumchlorid
ad 1 l

TY-Medium

20 g Select Pepton
10 g Hefeextrakt
10 g Natriumchlorid
ad 1 l

Der pH-Wert der Medien wurde auf 7 eingestellt. Bis zur Verwendung wurden die autoklavierte Lösung bzw. die Agarplatten bei 4°C aufbewahrt. Kurz vor der Verwendung wurde Ampicillin (100 µg/ml) zur Selektion der transformierten Bakterienzellen hinzugegeben.

LB-Agar

500 ml LB-Medium
7,5 g Select Agar

Der Agar wurde durch aufkochen gelöst, nach dem Abkühlen mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt und der noch warme Agar in 10 cm Petrischalen gegossen. Die abgekühlten Platten wurden bei 4°C gelagert.

2.2 Methoden

2.2.1 Retransformation von Bakterien

Zur Retransformation bestehender Plasmide wurden chemisch kompetente E.coli Zellen auf Eis aufgetaut. 10 µl Bakteriensuspension wurden mit 1 µl Plasmid-DNA versehen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme der DNA zu verbessern, erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C. Nach 2 Minuten auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, D) hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. 100 µl der Suspension wurden auf eine LB-Agarplatte (mit Ampicillin, 100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.2 Plasmidisolierung

Von den aus der Retransformation stammenden Agarplatten wurde eine Einzelkolonie in 5 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) übertragen und fünf Stunden bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde dann in 300 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) gegeben und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am folgenden Tag wurde die Bakterienkultur für 20 Minuten bei 4°C mit 6000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und aus dem Bakterienpellet erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA über Silikatmembranen mit dem „NucleoBond PC Kit“ (Midi/Maxipräparation) von Macherey-Nagel (Düren, D) nach Angaben des Herstellers.

2.2.3 Photometrische Messung von Plasmid-DNA

Zur Quantifizierung und Reinheitsbestimmung von DNA wurde diese mit dem Spektrophotometer Colibri (Titertek Berthold, Pforzheim, D) gemessen. Bestimmt wird die optische Dichte (OD), wobei DNA ein Absorptionsmaximum von 260 nm besitzt. Als Nullprobe wurde ddH₂O verwendet, in dem die Plasmide gelöst waren. Anhand der Absorptionskoeffizienten 260 nm/280 nm und 260 nm/230 nm konnte die Reinheit der Proben bestimmt werden. Um Kontaminationen wie Alkohole und Partikel auszuschließen, sollte für DNA der Koeffizient 260/280 bei 1,8, der Koeffizient 260/230 zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

2.2.4 Restriktionsanalyse

Zur Überprüfung des Erfolges der Retransformation wurde zusätzlich zur Sequenzierung eine Restriktionsanalyse mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Das Restriktionsenzym wurde so ausgewählt, dass das Plasmid nur einmal geschnitten wurde. 100 ng der Plasmid-DNA wurden mit 0,5 µl Restriktionsenzym NotI oder HindIII (50 U/µl, Fermentas, St. Leon Roth, D), 1 µl 10xPuffer (vom Hersteller des Enzyms Fermentas, St. Leon Roth, D) zu 10 µl Endvolumen aufgefüllt und bei 37°C eine Stunde inkubiert.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Elektrophorese wandern Teilchen abhängig von ihrer Ladung und Größe in einem elektrischen Feld unterschiedlich schnell. Bei der Auftrennung von DNA in Agarosegelen wird diese abhängig von ihrer Größe aufgetrennt, bestehende Sekundärstrukturen werden nicht aufgelöst (Lottspeich et al., 2006). Da die Effizienz der transienten Transfektion höher ist, wenn die Plasmide in der *supercoiled* Konformation vorliegen, wurden Agarosegele zur quantitativen Überprüfung der aufgereinigten Plasmide (Abschnitt 2.2.2) verwendet (McLenachan et al., 2007).

Zum Herstellen des Agarosegels wurde Agarose (1 % w/v, Invitrogen, Karlsruhe, D) in TAE-Puffer (40 mM Tris, 5 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8) durch Erhitzen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurden 0,3 µg/ml Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) dazugegeben und das Gemisch in die Gelkammer gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel verwendet. 10 µl des Restriktions-analyseansatzes wurden mit 1 µl 10x Ladepuffer (Qiagen, Hilden, D) versetzt und 5 µl der Lösung wurden auf das Agarosegel aufgetragen. Als Kontrolle wurden 100 ng des ungeschnittenen Plasmids aufgetragen. Als Größenstandard wurden 3 µl Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas, St. Leon Roth, D) verwendet. Unter Anlegen einer Spannung von 90 Volt für 30 Minuten wurden die Proben aufgetrennt. Zur Detektion der Plasmid-DNA wurde Ethidiumbromid verwendet, welches aufgrund der planaren Struktur in Nukleinsäuren interkaliert und durch UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

2.2.6 Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG-Eurofins (Ebersberg, D) durchgeführt. Nach den Vorgaben wurde 1 µg Plasmid-DNA mit 30 pmol Primer (siehe Punkt 2.1.8) versehen und auf 15 µl aufgefüllt. Ausgewertet wurden die Sequenzen mit dem Computerprogramm Contig Express (Invitrogen, Karlsruhe, D).

2.2.7 Kultivierung der HEK 293T G_{α16Gust44} Zelllinie

Die HEK 293T G_{α16Gust44} Zellen wurden bei 37°C und 5 % Kohlendioxid auf 10 cm Kulturschalen in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 1 % Penicillin, 1 % Streptomycin, 1 % L-Glutamin (DMEM + FCS) und G418-Antibiotikum (400 µg/ml) kultiviert. Hatten die Zellen 90 - 100 % Konfluenz erreicht wurden sie 3 bis 5 Minuten mit 5 ml Trypsinlösung inkubiert. Diese steril filtrierte Lösung bestand aus 0,05 % Trypsin (w/v) von Biochrom (Berlin, D) und 0,5 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) gelöst in PBS-Puffer (80 mM Na₂HPO₄, 23 mM NaH₂PO₄, 65 mM NaCl, pH 7,4). Nach Zugabe von DMEM + FCS wurden die Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 900 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml DMEM + FCS gelöst. Von dieser Zellsuspension wurden 0,5 bis 1,5 ml in eine neue Kulturschale überführt in der DMEM + FCS und G418 (400 µg/ml) vorgelegt waren. Alle verwendeten Medien und das Trypsin wurden vor der Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.2.8 Beschichten von Kulturgefäßen

Um das schnelle Ablösen der HEK 293T Zellen vom Boden der Kulturschalen und der 96-Loch-Platten für die funktionellen Calciummessungen zu verhindern, wurden diese mit poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D) beschichtet. Die Kulturschalen wurden mit 5 ml poly-D-Lysin (1 µg/ml) 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die 96-Loch-Platten wurde die Konzentration erhöht und mit 50 µl poly-D-Lysin (10 µg/ml) beschichtet. Nach 20 Minuten wurde die Lösung gründlich abgesaugt und die 96-Loch-Platten mit 100 µl ddH₂O pro Loch, bzw. die Kulturschalen mit 5 ml ddH₂O, gewaschen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.9 Transfektion von HEK293T G_{α16Gust44} Zellen

Wie beim Passagieren (Abschnitt 2.2.7) wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin von den Kulturschalen abgelöst, mit 5 ml DMEM + FCS in ein Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und das Zellpellet mit 5 ml DMEM + FCS gelöst. Je nach Zelldichte wurden circa 2,4 ml der Zellsuspension mit DMEM + FCS zu einem Endvolumen von 12 ml aufgefüllt. Davon wurden je 100 µl pro Loch in 96-Loch-Platten (schwarz mit klarem, flachem Boden von Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)) ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen transient mit den TAS2Rs transfiziert, um die Bittergeschmacksrezeptoren durch funktionelle Calcium-Messungen untersuchen zu können. Die Konfluenz der Zellen lag dabei zwischen 60 bis 80 %. Die Plasmid-DNA wurde mit DMEM (ohne FCS) als Mastermix für mehrere Reaktionsansätze vermischt, sodass 0,15 µg Plasmid-DNA (Endkonzentration) und 12,5 µl DMEM (ohne FCS) pro Loch vorlagen. Pro 96-Loch-Platte wurden 30 µl Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, D) in 1,25 ml DMEM (ohne FCS) gegeben, kurz geschüttelt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lipofectamin-DMEM-Gemisch wurde zu dem Plasmid-DMEM-Mastermix gegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das DMEM+FCS Medium in den Zellplatten ausgetauscht gegen 50 µl DMEM (ohne FCS) pro Loch. Dann wurden 25 µl des Plasmid-Lipofectamin-DMEM-Ansatzes zu den bestehenden 50 µl DMEM (ohne FCS) in jedes Loch pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) wurde der Transfektionsansatz von den Zellen abgenommen und durch 100 µl DMEM+FCS pro Loch ausgetauscht.

2.2.10.1 Funktionelle Calciummessungen

Die funktionelle Charakterisierung von Bittergeschmacksrezeptoren erfolgte durch intrazelluläre Calciummessungen mittels heterologer Expression. Die verwendeten HEK 293T Zellen waren stabil transfiziert mit dem chimären G-Protein G_{α16Gust44} wodurch sichergestellt wurde, dass die Signaltransduktion der membranständigen TAS2Rs über ein geeignetes G-Protein verläuft. Um die Lokalisation in der Plasmamembran der TAS2Rs zu gewährleisten wurden die ersten 45 Aminosäuren des Ratten-Somatostatinrezeptors Subtyp 3 an den N-Terminus der TAS2R angefügt (Ammon et al., 2002; Bufo et al. 2002). Die G-Protein Chimäre G_{α16Gust44} (zusammengesetzt aus dem N-Terminus von G_{α16} und den ersten 44 Aminosäuren des C-Terminus von α-Gustducin) stellt die Kopplung des Signalwegs zwischen den membranständigen TAS2Rs und der Phospholipase C (PLC) sicher (Offermanns et al., 1995; Ueda et al., 2003). Bindet ein Agonist an den Bitterrezeptor und aktiviert diesen wird eine Signalkaskade über das koexprimierte G-Protein ausgelöst und

führt zu einer Freisetzung von Calcium aus dem endoplasmatischen Retikulum. Der Calcium-sensitive Farbstoff Fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) chelatiert die Calciumionen wodurch dessen Fluoreszenz bis um das Hundertfache steigt (Gee et al., 2000).

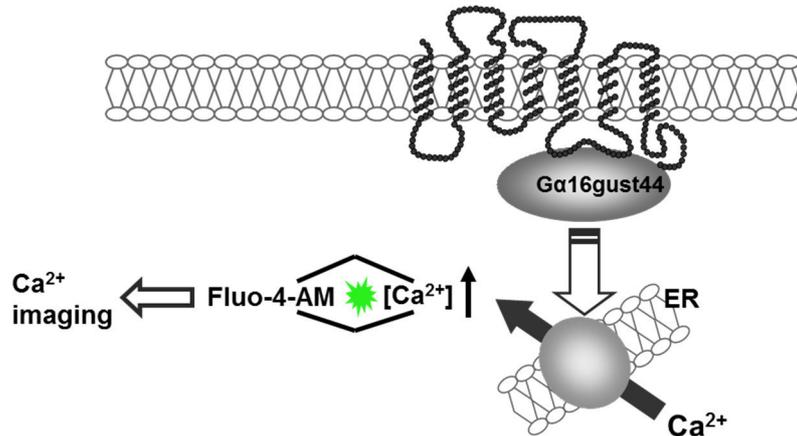


Abbildung 10: Grundlage der Calcium-Messungen (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Anne Brockhoff, modifiziert).

Bindet ein Ligand an den membranständigen TAS2R und führt zu einer Konformationsänderung wird das G-Protein aktiviert und damit der Signalweg der Phospholipase C (PLC). PLC katalysiert die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) welches an IP₃-abhängige Calciumkanäle bindet und so zum Ausstrom von Calciumionen aus dem endoplasmatischen Retikulum führt. Der sich im Cytosol befindliche Farbstoff bindet die Calciumionen und zeigt eine erhöhte Fluoreszenz, welche ausgelesen wird.

2.2.10. Calcium-Messungen durch das Fluoreszenzplattengerät FLIPR^{Tetra}

Wie in Abschnitt 2.2.9 beschrieben wurden die HEK293T G_{α16Gust44} Zellen auf 96-Loch-Platten ausgesät und mit den Bitterrezeptoren transfiziert. Am darauf folgenden Tag (circa 24 Stunden nach der Transfektion) wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluo-4-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) beladen. Nachdem das Medium von den Zellen abgenommen wurde, wurden in jedes Loch 50 µl Farbstofflösung bestehend aus 2,5 mM Probenecid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D), 2 µM Fluo-4-AM und DMEM (ohne FCS) pipettiert und eine Stunde im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) inkubiert. Probenecid ist ein Inhibitor von Anionentransportern und begünstigt das Verbleiben des Farbstoffs in der Zelle. Um überschüssigen Farbstoff der nicht durch die Zellmembran migriert ist zu entfernen, wurden diese im Plattenwaschgerät ELx50 (Biotek, Winooski, USA) mit C1-Puffer (2 mM CaCl₂, 10 mM Glukose, 10 mM HEPES, 5 mM KCl, 130 mM NaCl, pH 7,4) dreimal in einem Abstand von circa 20 Minuten gewaschen. Dabei wurde bei jedem

Waschschritt dreimal die auf den Zellen befindliche Flüssigkeit abgesaugt und gegen frischen C1-Puffer ausgetauscht. Beim letzten Waschschritt verblieben 100 µl C1-Puffer pro Loch auf den Zellen. Der dritte Waschschritt erfolgte unmittelbar vor den Messungen im FLIPR^{Tetra} (*Fluorometric Imaging Plate Reader* von Molecular Devices, München, D). Mit diesem Pipettierroboter können simultan alle Löcher der 96-Loch-Platte analysiert werden und die Testsubstanzen aus der Ligandenplatte (durchsichtige 96-Loch-Platten, TPP, Trasadingen, Schweiz) gleichzeitig appliziert werden, sodass 96 Einzelerperimente pro Messung möglich sind und im Hochdurchsatzverfahren die Reaktion der Zellen untersucht werden kann. Vor der Messung wurde durch einen Signaltest die Basisfluoreszenz durch eine verlängerte oder verkürzte Belichtungszeit auf einen Mittelwert von 1000 bis 1200 RLU (*Relative Light Units*) im Mittelwert eingestellt. Die Kameraverstärkung wurde dabei nicht verändert.

Die Fluoreszenzmessungen erfolgten mit folgenden Parametern:

Lichtquelle:	LED-Bank
Detektion:	CCD-Kamera
Kameraverstärkung:	120
Extinktionsintensität:	100 %
Belichtungszeit:	0,2 bis 0,7 Sekunden
Anregungswellenlänge:	470 nm bis 495 nm
Detektionswellenlänge:	515 nm bis 575 nm
Hintergrundfluoreszenz:	1000 bis 1200 RLU

Ablauf der Messung:

Basislinie:	10 Messungen, Abstand 2 Sekunden
1. Applikation:	50 µl der Testsubstanzen
	70 Messungen, Abstand 2 Sekunden
	18 Messungen, Abstand 10 Sekunden
2. Applikation:	50 µl der Vitalitätskontrolle
	70 Messungen, Abstand 2 Sekunden
	12 Messungen, Abstand 10 Sekunden

2.2.10.3 Vorbereitung der Ligandenplatten

In dieser Arbeit sollten neue Bittergeschmacksantagonisten gefunden werden. Eine Liste von 52 Bittersubstanzen wurde für acht Bittergeschmacksrezeptoren auf eine antagonistische Wirkung hin untersucht. Um möglichst hohe Konzentrationen der Testsubstanzen verwenden zu können und möglichst viele Substanzen als potenzielle Antagonisten testen zu können, wurden die Agonisten und die Testsubstanzen separat von einander in C1-Puffer gelöst und dann in unterschiedlichen Konzentrationen zusammengeführt. Wenn es möglich war, lagen die Substanzen als Stock-Lösung in DMSO vor. Ließen sich die Substanzen nicht bei Raumtemperatur lösen, wurden diese im Wasserbad erhitzt und auf einem Reaktionsgefäßschüttler (Vortex Genie 2, Scientific Industries, New York, USA) automatisch geschüttelt.

Während der Messung wurden die Lösungen aus der Ligandenplatte auf die Messplatte mit den darin befindlichen Zellen pipettiert. Dabei wurden die Lösungen der Testsubstanzen 1:3 verdünnt. Um eine definierte Endkonzentration auf den Zellen zu erreichen, wurden die Testsubstanzen in dreifacher Endkonzentration in die Ligandenplatte vorgelegt. Zur Kontrolle der Rezeptorspezifität des Fluoreszenzsignals wurden mehrere Kontrollen durchgeführt. Zum einen als Positivkontrolle und Referenzwert wurde der Agonist des zu untersuchenden Rezeptors allein appliziert. Zum anderen als Negativkontrollen C1-Puffer ohne Testsubstanz und mit der höchsten verwendeten DMSO Konzentration sowie mit einem Leervektor (im Weiteren auch als Mock bezeichnet) transfizierte Zellen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Leervektor dem Vektor entsprach, in dem der Rezeptor vorlag. Alle Testlösungen wurden in Duplikaten oder Triplikaten sowohl auf den Rezeptor-transfizierten, als auch auf den Mock-transfizierten, Zellen gemessen. Als Vitalitätskontrolle der Zellen fungierte die 2. Applikation von Somatostatin 14 (100 nM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D). Somatostatin aktiviert den endogen exprimierten Somatostatin Rezeptor und die Höhe des Fluoreszenzsignals gibt Aufschluss über die Vitalität der Zellen.

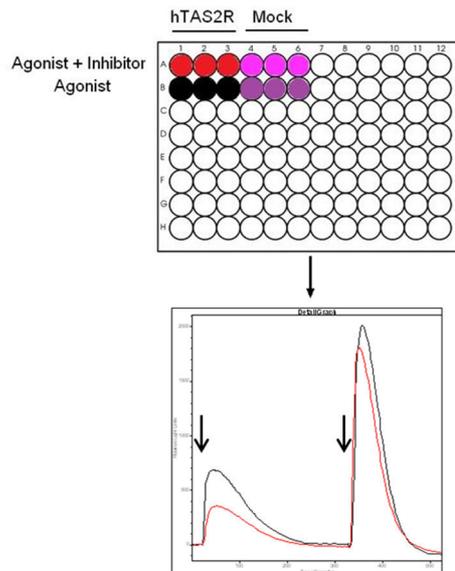


Abbildung 11: Experimenteller Aufbau der funktionellen Calcium-Messungen.

Oben zu sehen ist eine 96-Loch-Platte bei der beispielhaft das Transfektions- und Pipettierschema markiert wurde. Alle Testlösungen wurden als Triplikate zugesetzt. Zu den Rezeptor-transfizierten Zellen wurde der Agonist (schwarz) und der Agonist gleichzeitig mit dem Inhibitor (rot) hinzugegeben. Als Kontrolle dienten Mock-transfizierte Zellen zu denen auch der Agonist (dunkel lila) und der Agonist gleichzeitig mit dem Inhibitor (hell lila) gegeben wurde. Somit gab es für jede Testsubstanzen-Kombination und Kontrollen eine dazugehörige Mock-Kontrolle. Darunter abgebildet sind Originaldaten der Fluoreszenzmessungen zu sehen. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Applikationen an (zuerst die Testsubstanzen, dann die Vitalitätskontrolle). Der schwarze Graph stellt das Rezeptorsignal, bei dem nur der Agonist appliziert wurde dar. In rot ist das Rezeptorsignal bei gleichzeitiger Applikation des Agonisten und Inhibitors zu sehen.

2.2.10.4 Auswertung der Calcium-Messungen

Die Auswertung der Experimente erfolgte mit der Gerätesoftware ScreenWorks 3.1.14 (Molecular Devices, München, D). Die Fluoreszenzwerte der Mock-transfizierten Zellen (F_{Mock}) wurden im Programm von den dazugehörigen Rezeptorsignalen (F_{TAS2R}) abgezogen und die Maximalwerte des Rezeptorsignals wurden in Excel (Microsoft, Redmond, USA) exportiert. Die Werte der Hintergrundfluoreszenz-messungen (F_0), welche den ersten 10 Messungen vor der Applikation der Testsubstanzen entsprachen, wurden gemittelt und die Rezeptorsignale darauf normiert. Auch von der C1-Puffer-Kontrolle (F_{C1}) wurden die Fluoreszenzwerte der Mock-transfizierten Zellen abgezogen, exportiert und auf die Hintergrundfluoreszenz normiert. Von den C1-Puffer-Werten wurde der Mittelwert gebildet und von allen Rezeptorsignalen abgezogen.

$$\Delta F/F = ((F_{\text{TAS2R}} - F_{\text{Mock}}) / \bar{X} F_0) - \bar{X} ((F_{\text{C1}} - F_{\text{Mock}}) / \bar{X} F_0)$$

Um nachzuweisen, dass die Inhibition spezifisch für die transfizierten Bitterrezeptoren und nicht aufgrund von Artefakten oder mangelnder Vitalität der Zellen bei hohen Wirkstoffkonzentrationen war, wurden auch die Fluoreszenzwerte der Somatostatinapplikation und der Mock-transfizierten Zellen analysiert. Die Berechnung der $\Delta F/F$ -Werte für die Mock-transfizierten Zellen erfolgte durch exportieren der Maxima bzw. Minima der Fluoreszenzwerte im Bereich der Rezeptorsignale der 1. Applikation.

$$\Delta F/F = (F_{\text{Mock}} / \bar{X} F_0) - \bar{X} (F_{C1(\text{Mock})} / \bar{X} F_0)$$

Für die Auswertung der Somatostatinwerte (F_{SST}) wurden die Differenz der Fluoreszenzänderung zwischen Minima und Maxima der Signale exportiert, um unterschiedliche Basislinie zu berücksichtigen, und auf die Hintergrundfluoreszenz (F_0) normiert.

$$\Delta F/F = (F_{\text{Max(SST)}} - F_{\text{Min(SST)}}) / \bar{X} F_0$$

Die Berechnung der $\Delta F/F$ -Werte, der Standardabweichung und der statistischen Signifikanz (Studentischer T-Test, zweiseitig) wurde in Excel durchgeführt. Die Erstellung der Graphen und die Berechnung der nichtlinearen Regressionsgeraden und der EC_{50} bzw. IC_{50} -Werte erfolgte in Sigma Plot 12.3 (Systat Software, Erkrath, D). Es wurden stets drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente gemittelt. Folgende Formel wurde verwendet:

$$f(x) = \text{min} + (\text{max} - \text{min}) / (1 + (x/EC_{50})^{-nH})$$

3. Ergebnisse

Das allgewärtige Vorkommen von Bitterstoffen in der Natur, unserer Nahrung und medizinischen Präparaten macht die Bittergeschmacksstoffwahrnehmung zum Gegenstand intensiver Forschung. Da auch viele positiv auf physiologische Prozesse wirkende Substanzen bitter schmecken besteht großes Interesse an der Aufklärung auf molekularer Ebene und der Entwicklung von Hemmstoffen. In einer Studie von Brockhoff und Kollegen (2011) wurden drei Bitterstoffe untersucht, welche alle in Wermut vorkommen. Diese drei Sesquiterpenlactone wiesen eine hohe Strukturähnlichkeit zueinander auf, allerdings fungierten zwei als kompetitive Inhibitoren von TAS2R46 und die dritte Verbindung als Agonist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren von TAS2R46 sowohl Antagonisten weiterer Bittergeschmacks-rezeptoren, als auch Agonisten anderer Rezeptoren waren. Damit stellte sich ein neues Bild der Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung dar.

3.1 Identifizierung neuer Antagonisten von Bittergeschmacksstoffrezeptoren

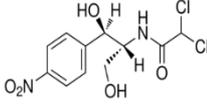
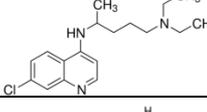
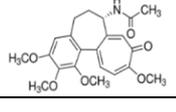
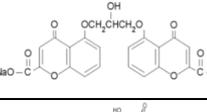
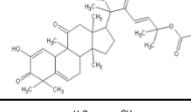
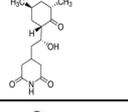
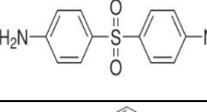
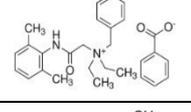
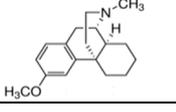
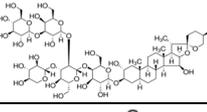
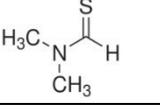
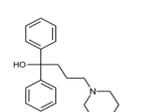
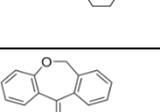
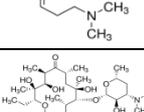
Auf der Suche nach weiteren Antagonisten wurde von Alessandro Marchiori eine Substanzbibliothek zusammengestellt und Vorversuche zum modulatorischen Potential der Verbindungen am TAS2R14 durchgeführt. Nachdem hierbei Bittersubstanzen identifiziert werden konnten, welche vermutlich Antagonisten des TAS2R14 sind, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie weit verbreitet das Prinzip von Bittersubstanzen ist, welche gleichzeitig als Agonisten und Antagonisten fungieren.

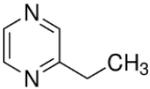
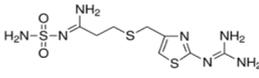
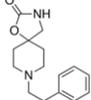
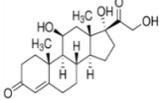
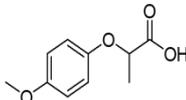
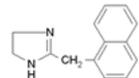
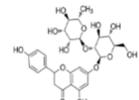
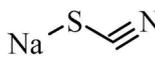
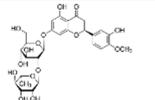
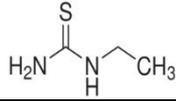
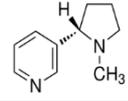
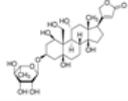
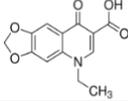
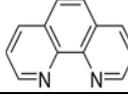
Die Substanzbibliothek (Tabelle 6) bestand aus 52 Bitterstoffen, davon waren 29 natürlicher und 23 synthetischer Herkunft. Die chemischen Strukturen reichten von kleinen Molekülen bis hin zu komplexen Verbindungen. Sie gehörten den unterschiedlichsten Substanzklassen an, wie zum Beispiel Alkaloide, Steroide, Pyrazine und Phenole, um nur einige zu nennen. Des Weiteren unterschieden sich die Bitterstoffe in ihrem Rezeptorenspektrum. Von 18 Stoffen war bekannt, dass sie nur einen Rezeptor aktivieren, 14 waren Agonisten von zwei bis drei TAS2Rs. Vier Substanzen aktivierten fünf und mehr Rezeptoren. Darunter Diphenidol, welches ein bekannter Aktivator von 15 TAS2Rs ist (Meyerhof et al., 2010a). Für 16 Substanzen war noch kein dazugehöriger Bitterrezeptor bekannt, allerdings wurden diese in der breit angelegten Deorphanisierungsstudie von Meyerhof und Kollegen (2010a) nicht untersucht.

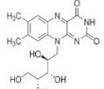
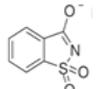
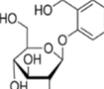
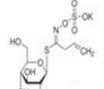
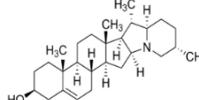
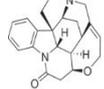
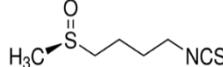
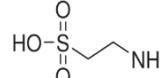
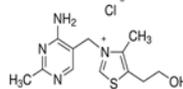
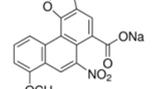
Tabelle 6: Liste der Testsubstanzen.

Angegeben ist die maximal applizierbare Konzentration (angelehnt an Meyerhof et al.; 2010a und durch selbst durchgeführte Vorexperimente), die zugehörige Substanzklasse (PubChem), der Ursprung (S = synthetische Verbindung, N = natürlich vorkommende Verbindung; PubChem), TAS2Rs, welche von der Substanz aktiviert werden (Meyerhof et al., 2010a) und die chemische Struktur (PubChem, Hersteller).

Substanz	Konzentration (mM)	Substanzklasse	Ursprung	Agonist TAS2R-	chemische Struktur
6-Methyl-2-thiouracil	0,3	Thioamid	S	38	
6-Propyl-2-thiouracil	0,5	Thiouracil	S	38	
Acetylpyrazin	1	Pyrazin	N		
Acetylthiourea	0,3	Thiourea	S	38	
Allylisothiocyanat	1	Senföl	N	38	
Aloin	0,01	Anthracen	N	43	
D-Amygdalin	10	Glucopyranosid	N	16	
Andrographolid	0,03	Diterpenoid	N	30, 46, 50	
Antipyrin	0,3	Pyrazol	S		
Arbutin	30	Glucopyranosid	N	16	
Aristolochiasäure I Natriumsalz	0,01	Alkaloid	N	14, 31, 43	
Brucin	0,1	Alkaloid	N	10, 46	
ε-Caprolactam	10	Lactam	S	38	

Substanz	Konzentration (mM)	Substanzklasse	Ursprung	Agonist TAS2R-	chemische Struktur
Chloramphenicol	0,3	Propylenglycol	N	1, 8, 10, 39, 41, 43, 46	
Chloroquin Diphosphat	2	Aminochinolin	S	3, 10, 39	
Colchicin	3	Alkaloid	N	4, 39, 46	
Cromolyn Natriumsalz	10	Pyran	S	7, 20, 43	
Cucurbitacin E	0,01	Terpenoid	N	10	
Cycloheximid	0,4	Piperidin	N	10	
Dapson	0,1	Sulfon	S	4, 10, 40	
Denatoniumbenzoat	3	Sulfonamid	S	4, 8, 10, 13, 30, 39, 43, 46	
Dextromethorphan Hydrobromid	0,01	Phenanthren	S	1, 10	
Digitonin	0,01	Steroid	N		
N,N-Dimethylthioformamid	0,3	Formamid	S	38	
Diphenidol	0,05	Piperidin	S	1, 4, 7, 10, 13, 14, 16, 20, 30, 31, 38, 39, 40, 43, 46	
Doxepin Hydrochlorid	0,01	Oxepin	S		
Erythromycin	0,3	Lacton	N	10	

Substanz	Konzentration (mM)	Substanzklasse	Ursprung	Agonist TAS2R-	chemische Struktur
Ethylpyrazin	3	Pyrazin	N	38	
Famotidin	0,3	Thiazol	S	10, 31	
Fenspirid Hydrochlorid	0,01	polycyclischer Aromat	S		
Hydrocortison	0,1	Steroid	N	46	
Lactisol	1	Phenol	N		
Naphazolin Hydrochlorid	0,00003	Imidazol	S		
Naringin	0,3	Flavonoid	N		
Natriumthiocyanat	3	Cyanat	S	1, 38	
Neohesperidin	0,1	Flavonoid	N		
N-Ethylthiourea	1	Urea	S	38	
Nicotin	0,1	Pyridin	N		
Ouabain Octahydrat	3	Steroid	N		
Oxolinsäure	0,1	Chinolin	S		
1,10-Phenanthrolin Monohydrat	0,1	Phenanthren	S	5	
Phenylthiocarbamid	0,1	Thiourea	S	38	

Substanz	Konzentration (mM)	Substanzklasse	Ursprung	Agonist TAS2R-	chemische Struktur
(-)-Riboflavin	0,00001	Flavin	N		
Saccharin Natriumhydratsalz	10	Sulfonamid	S	31, 43	
D-(-)-Salicin	10	Glucosid	N	16	
Sinigrin Hydrat	3	Pyranoside	N	16, 38	
Solanidin	0,01	Steroid	N		
Strychnin Nitratsalz	0,03	Alkaloid	N	10, 46	
L-Sulforaphan	0,3	Isothiocyanat	N		
Taurin	3	Alkan	N		
Thiamin Hydrochlorid	1	Thiazol	N	1, 39	
Yohimbin Hydrochlorid	0,2	Alkaloid	N	1, 4, 10,	

Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den im experimentellen Aufbau maximal möglich einsetzbaren. Limitiert sind die Substanzkonzentrationen zum einen durch die Löslichkeit. Waren die Substanzen in dem physiologischen C1-Puffer auch durch Erhitzen nicht lösbar, wurde DMSO verwendet. Dieses führt bei hohen Konzentrationen allerdings zu Artefakten in den funktionellen Experimenten und konnte daher nur in begrenzter Konzentration eingesetzt werden. Zum anderen können auch zu hohe Konzentrationen der Bitterstoffe zu unspezifischen Signalen führen. Um rezeptorunabhängige Signale identifizieren zu können, wurden alle Substanzen und Substanzgemische auch auf Leervektor-transfizierte Zellen appliziert. Für die Suche nach neuen Antagonisten, wurden acht Bittergeschmacksrezeptoren ausgewählt, welche in Tabelle sieben mit den verwendeten Agonisten aufgelistet sind. Nach Meyerhof und Kollegen (2010a) können die humanen Bittergeschmacksrezeptoren in vier Gruppen eingeteilt werden. Aus jeder dieser Gruppen wurden einer oder mehrere

TAS2Rs für die Studie ausgewählt. TAS2R9 und -R50 zählen zu den Bitterrezeptoren mit kleinem Agonistenspektrum; TAS2R10, -R14, -R46 hingegen zeigten ein außergewöhnlich weites Agonistenspektrum. Dazwischen befindet sich TAS2R43 mit 16 bekannten Agonisten. Zu den Bittergeschmacksrezeptoren, die mehrere Agonisten mit gleichen Strukturmerkmalen aufweisen, gehören TAS2R16 und -R38.

Tabelle 7: Auflistung der Testrezeptoren.

Aufgeführt sind die TAS2Rs mit den verwendeten Agonisten und deren Konzentration, der Substanzklasse, dem Ursprung (S = synthetische Verbindung, N = natürlich vorkommende Verbindung) und der chemischen Struktur (PubChem, Hersteller) der Agonisten. Die Agonisten wurden in der EC₉₀-Konzentration appliziert, welche zu einer 90%igen Sättigung des Rezeptorsignals führt (Behrens et al., 2004; Brockhoff et al., 2011; Slack et al., 2010). Für TAS2R9 wurde die maximal applizierbare Konzentration verwendet (Pirenzepin als Agonist von TAS2R9 wurde publiziert von Dotson et al., 2008; die maximal applizierbare Konzentration wurde in eigenen Experimenten bestimmt).

TAS2R-	Substanz	Konzentration EC ₉₀ (mM)	Substanzklasse	Ursprung	chemische Struktur
9	Pirenzepin Dihydrochlorid	2	Benzodiazepin	S	
10	Strychnin Nitratsalz	0,09	Alkaloid	N	
14	Picrotoxinin	0,07	Cyclohexan	N	
16	D-(-)-Salicin	3	Glucosid	N	
38	Phenylthiocarbamid	0,03	Thiourea	S	
43	Aristolochiasäure I Natriumsalz	0,0003	Alkaloid	N	
46	Picrotoxinin	0,3	Cyclohexan	N	
50	Andrographolid	0,1	Diterpenoid	N	

Um die Testsubstanzen als Inhibitoren der Bittergeschmacksrezeptoren zu identifizieren, wurden funktionelle Calcium-Messungen durchgeführt (Abschnitt 2.2.10.1). Durch diese Methode kann die Reaktion des Rezeptors auf unterschiedliche Wirkstoff-Kombinationen vermessen werden. In einer ersten Selektionsrunde wurden die Testsubstanzen in zwei Konzentrationen auf ihr Potential als mögliche Modulatoren der TAS2Rs getestet.

Abbildung elf zeigt ein Beispiel der Vorversuche auf TAS2R10. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale, welche hervorgerufen wurden durch den Agonisten alleine und den Agonisten appliziert zusammen mit der Testverbindung verglichen. Zwei Substanzen (Cromolyn und Phenanthrolin) zeigten ein reduziertes Rezeptorsignal und wurden in folgenden Experimenten als Antagonisten des TAS2R10 identifiziert. Abbildung elf (unten) zeigt zur Verdeutlichung die Wirkung von Cromolyn auf die Calcium-Signale von TAS2R10. Reduzierten die Testsubstanzen das Agonisten-induzierte TAS2R-Calciumsignal wurde der inhibitorische Effekt der Testsubstanzen mit drei verschiedenen Konzentrationen in An- und Abwesenheit des Agonisten validiert. Um unspezifische Calciumsignale auszuschließen, wurden alle Proben auch auf Leervektor-transfizierte Zellen appliziert. Scheinbar positive Modulatoren, welche das Rezeptorsignal erhöhten, stellten sich nach erneuter Überprüfung stets als falsch positiv heraus.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Potenz der gefundenen Antagonisten, sind aufgrund der unterschiedlichen maximalen Signalhöhen der Rezeptoren alle Graphen als Prozent der Rezeptoraktivierung mit dem Agonisten dargestellt. Das residuale Fluoreszenzsignal ($\Delta F/F$, nach der Normierung auf die Leervektor-transfizierten Zellen und dem Abzug der C1-Pufferkontrolle) des allein applizierten Agonisten ist in den Graphen angegeben. Aufgrund der großen Anzahl von gefundenen Antagonisten werden im Folgenden beispielhaft für jeden Rezeptor einige Graphen dargestellt. Alle Graphen sind vollständig mit den durchgeführten Kontrollen (Antagonist allein appliziert auf TAS2R-exprimierende Zellen, sowie alle Konzentrationen mit und ohne Agonist auf den Leervektor-transfizierten Zellen) im Anhang dargestellt.

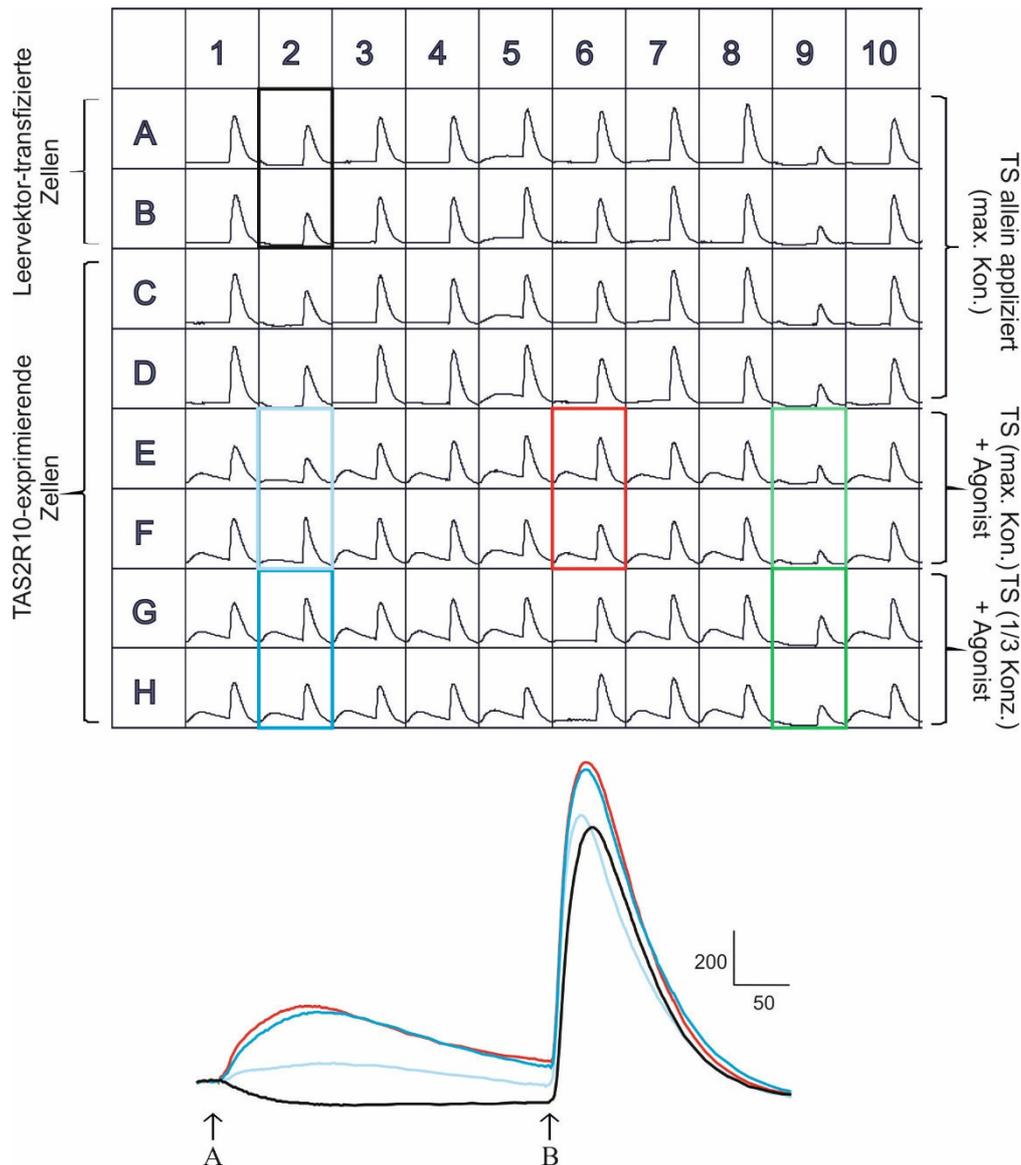


Abbildung 12: Erste Selektionsrunde der Testsubstanzen auf TAS2R10.

Oben dargestellt ist der experimentelle Aufbau zur Selektion möglicher Antagonisten aus der Substanzbibliothek auf TAS2R10. Die Testsubstanzen (TS) wurden in der maximal applizierbaren Konzentration (max. Konz.) und einem Drittel der Maximalkonzentration (1/3 Konz.) zusammen mit dem Agonisten (Strychnin) auf die TAS2R10-exprimierenden Zellen gegeben. Als Kontrolle diente die alleinige Applikation der Testsubstanzen in der höchsten Konzentration auf TAS2R10- und Leervektor-transfizierten Zellen. Jede Spalte (1 bis 5, 7 bis 10) entspricht einer Testsubstanz. Markiert sind die Testsubstanzen Cromolyn (blau) und Phenanthrolin (grün) welche das Agonisten-induzierte TAS2R10-Signal (rot) reduzierten.

Ausgehend von der oben abgebildeten Lochplatte wurden die Calciumspuren extrahiert (der Farbcode stimmt überein). Unten abgebildet sind die Calciumspuren der TAS2R10-exprimierenden Zellen induziert (A) durch den Agonisten Strychnin (rot), die simultane Applikation von Strychnin und der Maximalkonzentration von Cromolyn (hellblau) bzw. Strychnin zusammen appliziert mit einem Drittel der Maximalkonzentration von Cromolyn (dunkelblau). Zur Überprüfung unspezifischer Zellreaktionen wurde der Agonist im Gemisch mit Cromolyn (maximale Konzentration) auf die Leervektor-transfizierten Zellen appliziert (schwarz).

Als Kontrolle der Zellvitalität und anderer Störfaktoren diente die zweite Applikation von Somatostatin 14 (B), welches den endogenen Somatostatin-Rezeptor der Zellen aktiviert. Die Skala entspricht $y = 200$ relative Lichteinheiten und $x = 50$ Sekunden.

3.1.1 Antagonisten von TAS2R43

In der Bittersubstanzbibliothek aus 52 Verbindungen befanden sich sieben bekannte Agonisten vom TAS2R43. Alle nicht-aktivierenden 45 Bitterstoffe wurden als mögliche Antagonisten getestet. Sieben davon stellten sich als Inhibitoren heraus, exemplarisch dargestellt in Abbildung 13 sind drei der gefundenen Antagonisten für TAS2R43. Vier der insgesamt sieben Inhibitoren reduzierten das Rezeptorsignal von TAS2R43 stimuliert mit Aristolochiasäure um etwa 50 Prozent, beispielhaft an Caprolactam und Cycloheximid gezeigt. Eine vollständige Inhibition erfolgte bei der Zugabe von 0,2 mM Yohimbin. Von Caprolactam wurden maximal 10 mM appliziert. Hier zeigte sich Yohimbin, obwohl in 50fach geringerer Konzentration verwendet, als weitaus potenterer Antagonist. Cycloheximid wurde in nur geringfügig höherer Konzentration (0,4 mM) eingesetzt, führte aber - wie Caprolactam - nur zur Halbierung des Calciumsignals. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass höhere Konzentrationen der Antagonisten zu einer vollständigen Inhibition führen würden. Allerdings sind diese aufgrund von Artefakten im Messsystem und Löslichkeitsgrenzen nicht einsetzbar. Als partielle Agonisten stellten sich die Inhibitoren nicht dar, da sie allein appliziert auf die TAS2R43-exprimierenden Zellen keine Erhöhung der Calciumspur zeigten (siehe Anhang). Partielle Agonisten rufen nur eine geringe Rezeptorantwort hervor, bei simultaner Applikation mit einem potenteren Agonisten konkurrieren sie jedoch um die Bindungstasche und führen zu einer Reduktion des Signals.

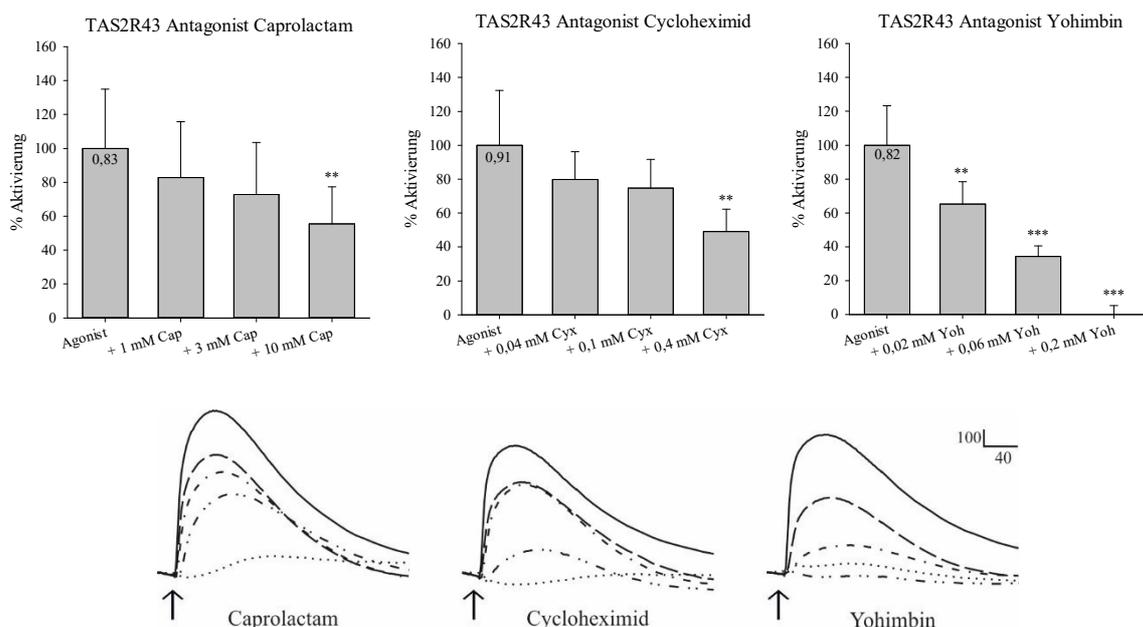


Abbildung 13: Beispiele für Antagonisten von TAS2R43.

Oben in den Graphen gezeigt sind von links nach rechts jeweils der Agonist Aristolochiasäure allein appliziert, gefolgt von simultaner Applikation des Agonisten mit dem Inhibitor in steigender Konzentration (Cap = Caprolactam, Cyx = Cycloheximid, Yoh = Yohimbin) auf TAS2R43-exprimierende Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Das residuale Fluoreszenzsignal des Agonisten allein appliziert ist als Referenzwert in dem Graphen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen aktiviert mit Aristolochiasäure(—), gefolgt von gleichzeitiger Applikation (Pfeil) von Aristolochiasäure und steigenden Konzentrationen des Inhibitors (niedrigste Konzentration — — —; mittlere Konzentration - - - -; höchste Konzentration - · · -). Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen sind den Graphen zu entnehmen. Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und der höchsten Konzentration des Inhibitors sind als Negativkontrolle gezeigt (·····). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

3.1.2 Antagonisten von TAS2R16 und TAS2R38

Unter den bekannten Agonisten des TAS2R38 befinden sich einige mit einem NCS-Motiv (Bufe et al., 2005), und auch bei den aktivierenden Bitterstoffen des TAS2R16 lässt sich oft eine gemeinsame funktionelle Gruppe (β -D-Glucopyranosid) finden (Bufe et al., 2002). Um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur von Agonisten und Antagonisten zu untersuchen, wurden diese Rezeptoren ausgewählt.

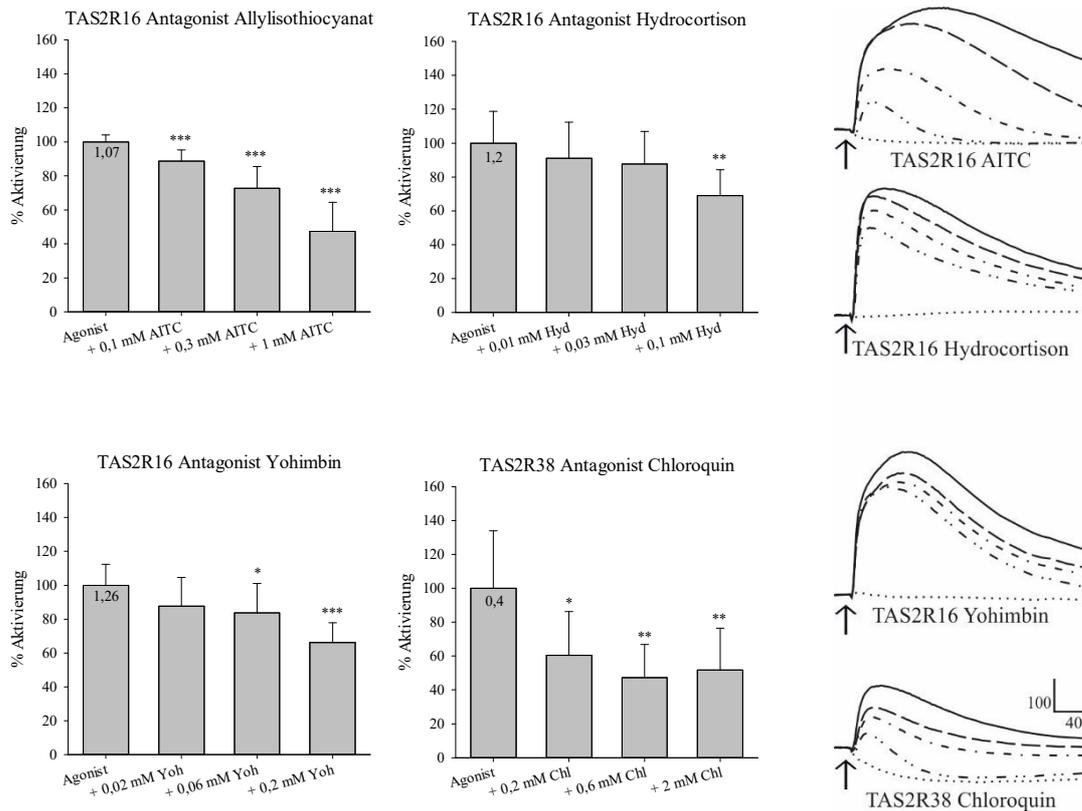


Abbildung 14: Beispiele der Antagonisten von TAS2R16 und -R38.

In den Graphen gezeigt sind von links nach rechts jeweils der Agonist (TAS2R16 Salicin 3 mM, TAS2R38 Phenylthiocarbamid 30 μ M) allein appliziert gefolgt von simultaner Applikation des Agonisten mit dem Inhibitor in steigender Konzentration (AITC = Allylthiocyanat, Hyd = Hydrocortison, Yoh = Yohimbin, Chl = Chloroquin) auf TAS2R-exprimierende Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Das residuale Fluoreszenzsignal des Agonisten allein appliziert ist als Referenzwert in dem Graphen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Rechts dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen aktiviert mit dem Agonisten (—), gefolgt von gleichzeitiger Applikation (Pfeil) des Agonisten und steigenden Konzentrationen des Inhibitors (niedrigste Konzentration — — —; mittlere Konzentration - - - -; höchste Konzentration - · · -). Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen sind den Graphen zu entnehmen. Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und der höchsten Konzentration des Inhibitors sind als Negativkontrolle gezeigt (· · · · ·). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

Die Substanzbibliothek enthielt auch Agonisten des TAS2R16 und -R38. So wurden in der vorliegenden Arbeit auf TAS2R16 47 Verbindungen und auf TAS2R38 39 Bitterstoffe als Antagonisten geprüft. Bei den insgesamt fünf TAS2R16-Antagonisten und den zwei TAS2R38-Antagonisten trägt nur Allylthiocyanat (AITC) eine NCS-Gruppe, ein β -D-Glucopyranosid lässt sich bei keinem der Inhibitoren finden. AITC stellte sich als breitbandiger Inhibitor heraus, wie später in diesem Kapitel in Tabelle acht deutlich werden wird. Im Vergleich zu den anderen Testrezeptoren, besaß TAS2R16 das weitaus höchste Agonisten-induzierter Fluoreszenzsignal ($\Delta F/F \geq 1$) und wurde von keiner der Testsubstanzen vollständig inhibiert.

Yohimbin, in einer Konzentration von 0,2 mM appliziert, reduzierte das Rezeptorsignal, hervorgerufen durch den Agonisten Salicin, nur um 34 Prozent. Somit war Yohimbin, obwohl in gleicher Konzentration verwendet, ein weitaus potenterer Inhibitor von TAS2R43 als für TAS2R16. Chloroquin hatte einen inhibitorischen Effekt auf beide Rezeptoren (Tabelle 8), zeigte allerdings mit steigenden Konzentrationen keine stärkere Inhibition. Hydrocortison inhibierte TAS2R16 um 31 Prozent und war ein spezifischer Antagonist des TAS2R16, da die Substanz bei allen anderen sieben Testrezeptoren kein inhibitorisches Potential zeigte.

3.1.3 Antagonisten von TAS2R10, TAS2R14 und TAS2R46

Die humanen Bittergeschmacksrezeptoren TAS2R10, -R14 und -R46 zeichnen sich durch ein ausgesprochen weites Agonistenspektrum aus, wobei bislang keine allgemeinen chemischen Merkmale ausgemacht werden konnten (Levit et al., 2014). Ausgehend von 39 getesteten Bittersubstanzen wurden für TAS2R10 vier Antagonisten gefunden, für TAS2R14 aus 50 Testverbindungen sechs Inhibitoren und für TAS2R46 wurden fünf inhibitorisch wirkende Substanzen aus insgesamt 43 Bitterstoffen identifiziert.

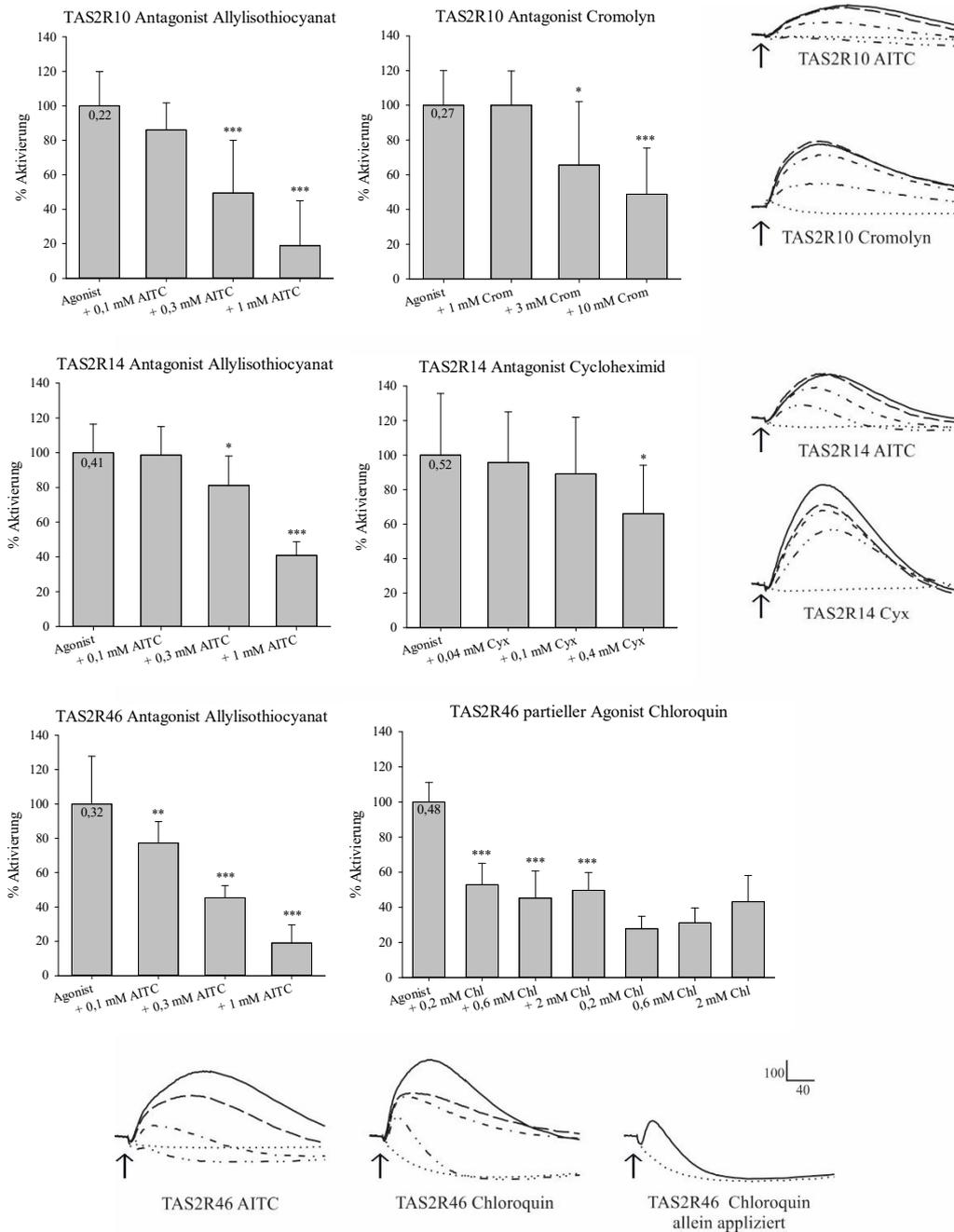


Abbildung 15: Beispiele der Antagonisten von TAS2R10, -R14 und -R46.

Oben in den Graphen gezeigt sind von links nach rechts jeweils der Agonist (TAS2R10 Strychnin 90 μ M, TAS2R14 Picrotoxinin 70 μ M, TAS2R46 Picrotoxinin 300 μ M), allein appliziert gefolgt von simultaner Applikation des Agonisten mit dem Inhibitor in steigender Konzentration (AITC = Allylithiocyanat, Crom = Cromolyn, Cyx = Cycloheximid, Chl = Chloroquin) auf TAS2R-exprimierende Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Das residuale Fluoreszenzsignal des Agonisten allein appliziert ist als Referenzwert über dem Graphen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen aktiviert mit dem Agonisten (—), gefolgt von gleichzeitiger Applikation (Pfeil) des Agonisten und steigenden Konzentrationen des Inhibitors (niedrigste Konzentration — — —; mittlere Konzentration - - - -; höchste Konzentration - · · -). Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen sind den Graphen zu entnehmen. Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und der höchsten Konzentration des Inhibitors sind als Negativkontrolle gezeigt (· · · · ·). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

AITC stellte sich auch bei diesen Rezeptoren als Antagonist heraus, wobei das Calciumsignal von TAS2R10 mit dem Agonisten Strychnin und TAS2R46 mit Picrotoxinin als Agonist auf 19 Prozent verringert wird. Das Rezeptorsignal von TAS2R14 auch hervorgerufen von Picrotoxinin wurde auf 41 Prozent reduziert. Zeigt AITC (1 mM) bei TAS2R10 eine fast vollständige Inhibition, reduzierte Cromolyn in 10fach höherer Konzentration (10 mM) das Signal nur um circa die Hälfte. Gleiches gilt für Cycloheximid beim TAS2R14, welches in einer 0,4 millimolaren Konzentration das Signal auf 66 Prozent erniedrigt, wohingegen AITC zu einer rund 40 Prozent kleineren Rezeptorantwort führt. Des Weiteren wurde mit Picrotoxinin der gleiche Agonist für TAS2R14 und TAS2R46 verwendet. Die Bittergeschmacksrezeptoren besitzen vier gemeinsame Antagonisten (AITC, Chloroquin, Cromolyn, Phenanthrolin), von denen nur Cromolyn beide Rezeptoren in gleichem Maße (um ca. 10 Prozent) inhibiert. Allerdings ist das inhibitorische Potential von Cromolyn für den TAS2R14 und TAS2R46 schwach und statistisch nicht signifikant. Die anderen genannten Antagonisten unterscheiden sich in ihrer Potenz und wirken auch auf andere TAS2R als Inhibitoren. Chloroquin stellte sich als partieller Agonist von TAS2R46 heraus.

Bei der Suche nach neuen Antagonisten konnten für TAS2R46 drei bisher unbekannte Agonisten identifiziert werden (Abbildung 16).

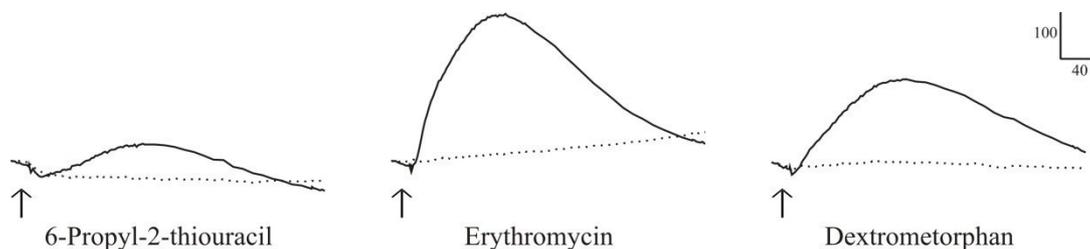


Abbildung 16: Agonisten des TAS2R46.

Gezeigt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen (—) aktiviert mit 6-Propyl-2-thiouracil (500 μ M), Erythromycin (300 μ M) und Dextrometorphan (10 μ M). Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen appliziert mit dem Agonisten sind als negativ Kontrolle gezeigt (·····). Die Skala entspricht y = 100 relative Lichteinheiten und x = 40 Sekunden.

3.1.4 Antagonisten von TAS2R50

Für TAS2R50 sind bisher nur drei Agonisten bekannt, da sich einer davon (Andrographolid) in der Bittersubstanzbibliothek befindet konnten die übrigen 51 Verbindungen als Antagonisten getestet werden. Mit 14 inhibitorisch wirkenden Verbindungen wurden doppelt so viele Antagonisten wie für den TAS2R43 identifiziert. Dabei sind sieben natürlichen und sieben synthetischen Ursprungs. Aufgrund der Fülle von Antagonisten wird in Abbildung 17 eine Auswahl gezeigt.

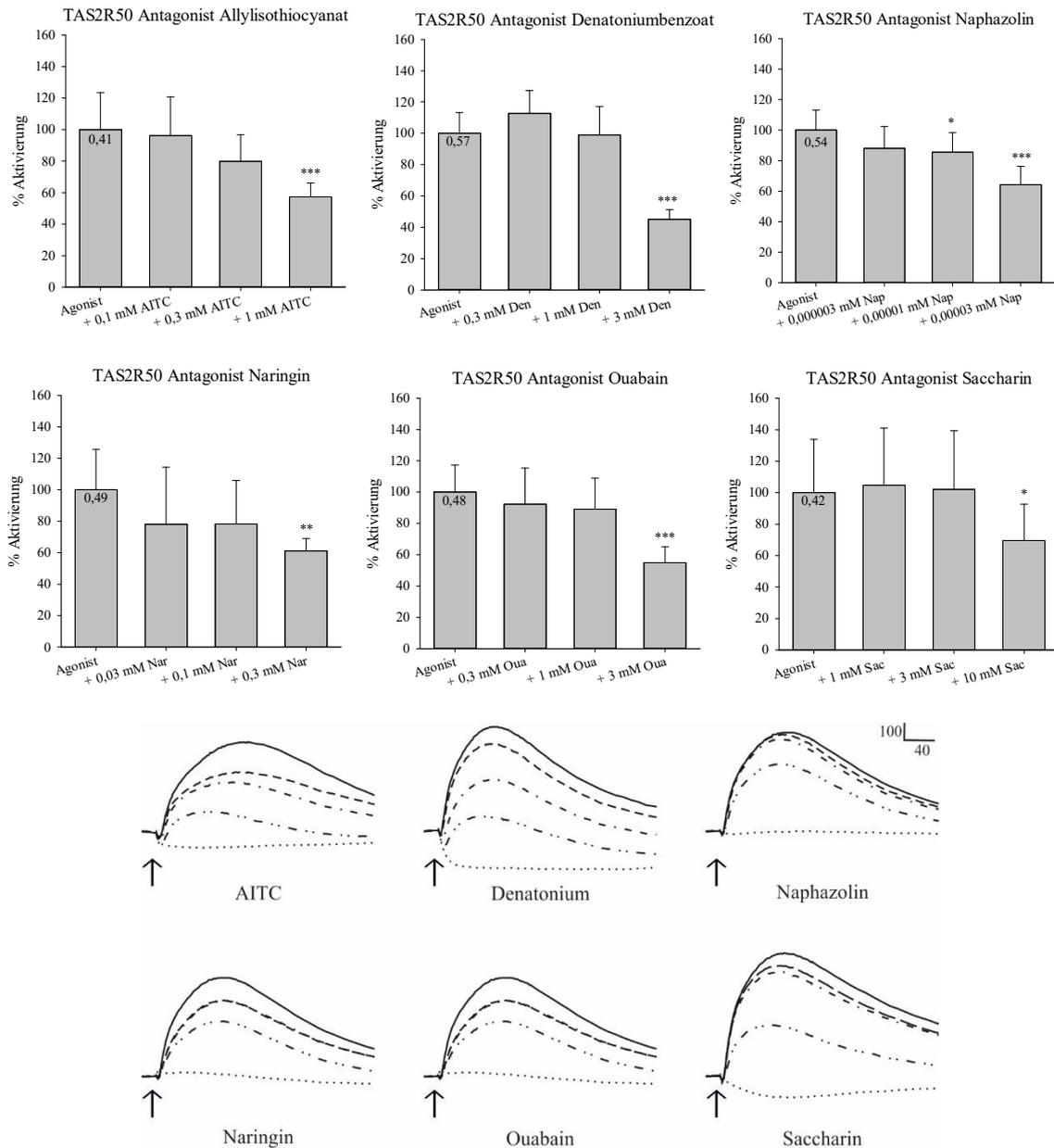


Abbildung 17: Beispiele der Antagonisten von TAS2R50.

Oben in den Graphen gezeigt sind von links nach rechts jeweils der Agonist (Andrographolid 100 µM), allein appliziert gefolgt von simultaner Applikation des Agonisten mit dem Inhibitor in steigender Konzentration (AITC = Allylisothiocyanat, Den = Denatoniumbenzoat, Nap = Naphazolin, Nar = Naringin, Oua = Ouabain, Sac = Saccharin) auf TAS2R-exprimierende Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Das residuale Fluoreszenzsignal des Agonisten allein appliziert ist als Referenzwert über dem Graphen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen aktiviert mit dem Agonisten (—), gefolgt von gleichzeitiger Applikation (Pfeil) des Agonisten und steigenden Konzentrationen des Inhibitors (niedrigste Konzentration — — —; mittlere Konzentration - - - -; höchste Konzentration - · · -). Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen sind den Graphen zu entnehmen. Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und der höchsten Konzentration des Inhibitors sind als Negativkontrolle gezeigt (·····). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

Keiner der identifizierten Antagonisten reduzierte das Calciumsignal von TAS2R50-exprimerenden Zellen auf Andrographolid vollständig (Tabelle 8). Bei vielen Inhibitoren zeigte sich nur eine mäßige Inhibition von ungefähr 15 bis 40 Prozent. Die stärkste Verringerung des Signals riefen mit nahezu 60 Prozent Denatoniumbenzoat und mit über 50 Prozent Yohimbin hervor. Saccharin reduzierte in der höchsten applizierten Konzentration von 10 mM die Rezeptorantwort um 30 Prozent, AITC dagegen bei einer ein millimolaren Konzentration bereits um 43 Prozent. Die Antagonisten Denatoniumbenzoat, Naphazolin, Naringin und Ouabain sind spezifische Antagonisten von TAS2R50. Bei allen weiteren sieben getesteten Bittergeschmacksrezeptoren zeigten diese Substanzen keine inhibitorische Wirkung. Naphazolin in 1000fach geringerer Konzentration (0,3 µM, auf 64 Prozent) appliziert verminderte das TAS2R50-Signal ähnlich stark wie Naringin (0,3 mM, auf 61 Prozent). Für TAS2R50 wurde mit Abstand die größte Anzahl an Antagonisten gefunden, obwohl die Anzahl der getesteten Bitterstoffe bei TAS2R10 ähnlich hoch war (TAS2R50 51 Verbindungen, TAS2R10 50 Verbindungen) wurden für diesen Rezeptor nur sechs Antagonisten identifiziert.

3.1.5 Antagonisten von TAS2R9

Nach den Ergebnissen der Experimente für TAS2R50, sollte ein weiterer Rezeptor mit nur wenigen bekannten Agonisten untersucht werden. Hierfür wurde TAS2R9 mit bis dato drei bekannten Agonisten ausgewählt. Dieser Rezeptor mit dem Agonisten Pirenzepin weist - im Vergleich zu den anderen Bittergeschmacksrezeptoren mit engem Agonistenspektrum, welche noch nicht getestet wurden - ein solides Fluoreszenzsignal auf.

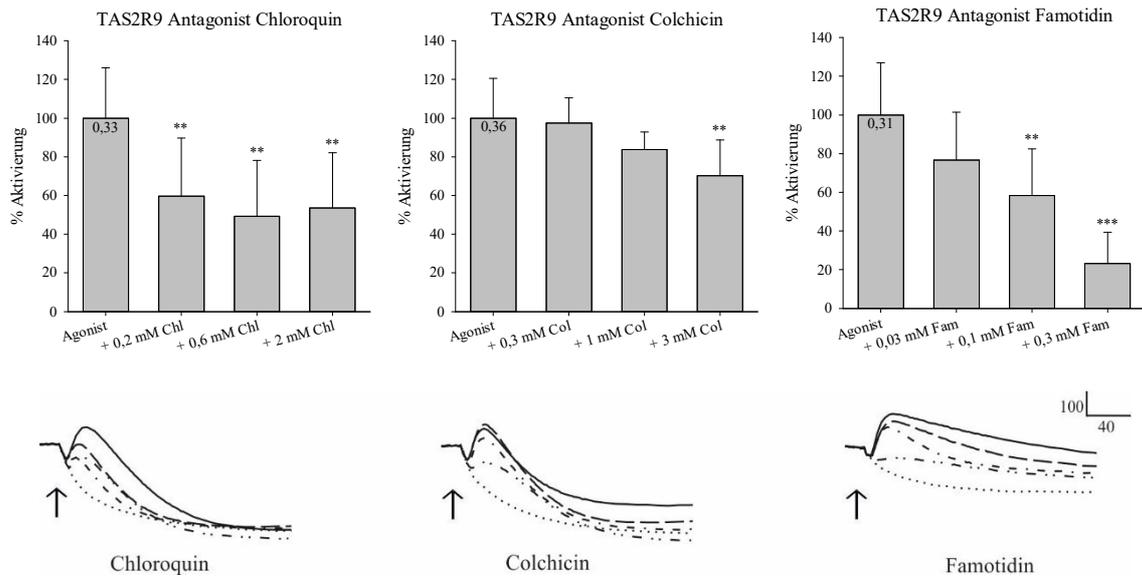


Abbildung 18: Beispiele der Antagonisten von TAS2R9.

Oben in den Graphen gezeigt sind von links nach rechts jeweils der Agonist (TAS2R9 Pirenzepin 2 mM), allein appliziert gefolgt von simultaner Applikation des Agonisten mit dem Inhibitor in steigender Konzentration (Chl = Chloroquin, Col = Colchicin, Fam = Famotidin) auf TAS2R-exprimierende Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Das residuale Fluoreszenzsignal des Agonisten allein appliziert ist als Referenzwert über dem Graphen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierte Zellen aktiviert mit dem Agonisten (—) und der gleichzeitigen Applikation (Pfeil) des Agonisten und steigenden Konzentrationen des Inhibitors (niedrigste Konzentration — — —; mittlere Konzentration - - - -; höchste Konzentration - · · -). Die verwendeten Inhibitor-Konzentrationen sind den Graphen zu entnehmen. Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierte Zellen mit dem Agonisten und der höchsten Konzentration des Inhibitors sind als Negativkontrolle gezeigt (· · · · ·). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

Alle 52 Stoffe aus der Bittersubstanzbibliothek wurden als Antagonisten auf den TAS2R9 getestet und davon wurden fünf als Inhibitoren identifiziert. Beispielfhaft sind in Abbildung 18 Chloroquin, Colchicin und Famotidin gezeigt. Wie schon bei TAS2R38 (Abbildung 14) zeigte auch bei TAS2R9 Chloroquin keine konzentrationsabhängige Inhibition und minimierte das TAS2R9-Signal mit dem Agonisten Pirenzepin auf 54 Prozent. Colchicin (3 mM) wurde im ähnlichen Konzentrationsbereich wie Chloroquin (2 mM) appliziert und inhibierte das Rezeptorsignal auf 70 Prozent. Von den fünf Antagonisten führte nur Famotidin zu einer fast vollständigen Inhibition und wirkte nur auf den TAS2R9 als Antagonist.

3.1.6 Vergleichende Darstellung aller gefundenen Antagonisten

Eine Übersicht aller identifizierten Antagonisten aus der Bittersubstanzbibliothek (Tabelle 6) gibt Tabelle 8. Hier wird die inhibitorische Potenz der Bitterstoffe, appliziert in deren maximal möglichen Konzentration, auf die acht getesteten Bittergeschmacksrezeptoren wiedergegeben.

Tabelle 8: Auflistung aller gefundenen Rezeptor-Inhibitor-Paare. Wirkten die Substanzen als Inhibitoren (Inh), sind sie grau markiert. Angegeben ist die Reduktion des Rezeptorsignals (hervorgerufen durch den jeweiligen Agonisten) auf x% bei der Applikation der maximal möglichen Konzentration der Testsubstanz. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. In Klammern wurden die Substanzen gesetzt, für die keine statistische Signifikanz vorliegt. Für diese sind die p-Werte angegeben (Student'schen t-Test). Wirkte die Substanz als Agonist auf einem Rezeptor ist dieses mit einem A verzeichnet (Meyerhof et al., 2010a). *Für diese Experimente wurde der Agonist Picrotoxinin in seiner EC₅₀-Konzentration 0,02 mM eingesetzt.

Substanz	TAS2R-							
	9	10	14	16	38	43	46	50
6-Methyl-2-thiouracil					A			Inh 65
Allylisothiocyanat	Inh 77	Inh 19	Inh 41	Inh 47	A	Inh 71	Inh 19	Inh 57
Arbutin			Inh 60	A				
Caprolactam					A	Inh 56		
Chloramphenicol		A				A	A	(Inh 83) p = 0,07
Chloroquin	Inh 54	A	Inh 0	Inh 48	Inh 52	Inh 50	Inh 50	
Colchicin	Inh 70					Inh 55	A	(Inh 76) p = 0,29
Cromolyn		Inh 49	(Inh 90) p = 0,26			A	(Inh 89) p = 0,13	Inh 66
Cycloheximid		A	Inh 66			Inh 49		
Denatoniumbenzoat		A				A	A	Inh 41
Doxepin								(Inh 77) p = 0,08
Famotidin	Inh 23	A						

Substanz	TAS2R-							
	9	10	14	16	38	43	46	50
Hydrocortison				Inh 69			A	
Naphazolin								Inh 64
Naringin								Inh 61
Ouabain								Inh 55
Phenanthrolin	Inh 49	Inh 33	Inh 27*	Inh 85	Inh 0	Inh 79	Inh 40	Inh 84
Saccharin		(Inh 89) p = 0,18				A	(Inh 88) p = 0,26	Inh 70
Sinigrin				A	A			Inh 58
Yohimbin		A		Inh 66	A	Inh 0	A	Inh 47
Anzahl der Inhibitoren	5	4	6	5	2	7	5	14
Summe der getesteten Substanzen	52	39	50	47	39	45	43	51

In der Zusammenfassung zeigt sich, dass von 52 Testsubstanzen 20 eine inhibierende Wirkung auf einen oder mehrere der getesteten acht Bittergeschmacksrezeptoren haben. Zu beachten ist, dass einige der Testsubstanzen Agonisten der ausgewählten Rezeptoren sind und nicht für jeden Rezeptor die gleiche Anzahl an Testsubstanzen vorlag. So befanden sich in der Substanzbibliothek 13 bekannte Agonisten von TAS2R10, wodurch sich eine Gesamtzahl von 39 Testsubstanzen ergab. Für den TAS2R50 wurden 51 Substanzen der Gesamtliste getestet, da diesen Rezeptor nur die Testverbindung Andrographolid aktiviert. Für einige der Antagonisten-Rezeptor-Paare konnte keine statistische Signifikanz der Inhibition nach Zusammenfassen der Triplikate festgestellt werden. Da aber in den Einzelexperimenten eine Inhibition zu erkennen war, wurden diese in die Liste der Antagonisten mit aufgenommen. Im Anhang befinden sich die Graphen der einzelnen Experimente. Im Detail inhibieren 12 Verbindungen nur einen Rezeptor, wobei acht TAS2R50 (Agonist Andrographolid) zugeschrieben werden können. Auch TAS2R9 (Agonist Pirenzepin), -R14 (Agonist PicROTOXININ), -R16 (Agonist Salicin) und -R43 (Agonist Aristolochiasäure) besitzen rezeptorspezifische Antagonisten (Tabelle 8). So reduzierte Famotidin nur das Calciumsignal

ein Antagonist von TAS2R16 und Caprolactam ein spezifisch auf TAS2R43 wirkender Inhibitor. Cycloheximid stellte sich als Antagonist von TAS2R14 mit einer Signalreduktion auf 66 Prozent und von TAS2R43 mit einer Minimierung auf 49 Prozent heraus.

Colchicin, Saccharin und Yohimbin inhibierten jeweils drei TAS2Rs, wobei Yohimbin und Colchicin eine teilweise Überlappung zeigten mit der inhibitorischen Wirkung auf TAS2R43 und -R50. Für diese beiden Antagonisten ist deren inhibitorische Potenz individuell für jede Rezeptor-Inhibitor-Kombination. Zum Beispiel war die Inhibition von Yohimbin (0,2 mM) auf dem TAS2R43 vollständig. Colchicin in 10fach höherer Konzentration (3 mM) hingegen reduzierte das TAS2R43-Signal nur um circa die Hälfte. Das Calciumsignal von TAS2R50 mit dem Agonisten Andrographolid wurde von Colchicin auf 76 Prozent, vom Antagonisten Yohimbin dagegen auf 47 Prozent inhibiert. Des Weiteren wirkte Yohimbin auch antagonistisch auf den TAS2R16 aktiviert mit Salicin. Hier zeigte Yohimbin die schwächste Inhibition mit einer Reduktion des TAS2R16-Signals auf 66 Prozent. Saccharin reduzierte die Calciumsignale von TAS2R10 und -R46 mit den spezifischen Agonisten appliziert nur gering (89 bzw. 88 Prozent). Das TAS2R50-Signal wurde von Saccharin auf 70 Prozent verringert. Vier Bittergeschmacksrezeptoren wurden von Cromolyn inhibiert. Dabei ist die Inhibition von TAS2R14 und -R46 nur gering auf 90 bzw. 89 Prozent, wobei beide Rezeptoren mit Picrotoxinin in unterschiedlichen EC_{90} -Konzentrationen (70 bzw. 300 μ M) aktiviert wurden. Auf 66 Prozent wurde das Rezeptorsignal des TAS2R50 verringert. Am stärksten von allen Rezeptoren wirkte Cromolyn auf TAS2R10 mit einer Signalreduktion auf 49 Prozent.

Drei Substanzen (Allylthiocyanat, Chloroquin, Phenanthrolin) stellten sich als breitbandige Inhibitoren heraus. Chloroquin wurde als Antagonist von sechs TAS2Rs identifiziert, wobei es nur bei TAS2R14 zu einer vollständigen Reduktion des Signals kam. Die anderen fünf Rezeptoren wurden unabhängig von der Höhe des Rezeptorsignals, hervorgerufen durch die jeweiligen Agonisten, um circa die Hälfte inhibiert. So war das Fluoreszenzsignal von TAS2R16 ($\Delta F/F = 1,1$; Anhang S.117) mehr als dreimal höher als das des TAS2R9 ($\Delta F/F = 0,33$; Abbildung 18). Der Verlauf der Calciumspur änderte sich zwar bei steigenden Konzentrationen von Chloroquin, nach der Normierung auf die Leervektor-transfizierten Zellen zeigte das residuale Fluoreszenzsignal aber keine verstärkte Inhibition (Abbildung 18). Allylthiocyanat (AITC) minimierte das Signal von TAS2R10 und -R46 auf 19 Prozent, das Signal von TAS2R14, -R16 und -R50 auf 41 bis 57 Prozent. Die geringste inhibitorische Potenz zeigte AITC bei TAS2R9 und -R43 mit dem Absenken der Signalhöhe auf 77 bzw. 71 Prozent. Diese Cyanatverbindung ist bekanntlich ein Agonist des TAS2R38 und nach der Entdeckung, dass Chloroquin ein partieller Agonist des TAS2R46 ist, wurde auch AITC auf eine mögliche inhibitorische Wirkung auf den TAS2R38 getestet. Allerdings konnte keine Reduktion des Rezeptorsignals festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Phenanthrolin

zeigte sich als Antagonist für alle acht getesteten Bittergeschmacksrezeptoren und dessen inhibitorisches Potential wird detailliert im nächsten Punkt beschrieben.

3.1.7 Phenanthrolin als breitbandiger Antagonist

Phenanthrolin, ein bekannter Agonist von TAS2R5 (Meyerhof et al., 2010a), stellte sich als Inhibitor für alle acht getesteten Bitterrezeptoren heraus. In Abbildung 19 ist die inhibitorische Wirkung von Phenanthrolin exemplarisch für sechs Rezeptoren dargestellt.

Obwohl Phenanthrolin immer in den gleichen Konzentrationen (maximal applizierbare Konzentration 100 μM) verwendet wurde, führte die Substanz zu unterschiedlich hohen Reduktionen der Rezeptorsignale. Die Signale der jeweiligen Agonisten von TAS2R16, -R43 und -R50 wurden bei der Zugabe von 100 μM Phenanthrolin auf 85, 79 bzw. 84 Prozent reduziert. Die Calciumspuren von TAS2R9, -R10 und -R46 aktiviert mit den jeweiligen Agonisten wurden auf 49, 33 bzw. 40 Prozent minimiert. Auch zwischen der anfänglichen Signalthöhe der Rezeptor-transfizierten Zellen mit alleiniger Applikation des spezifischen Agonisten und der Stärke der Inhibition bei gleichzeitiger Zugabe der höchsten Konzentration von Phenanthrolin (100 μM) lässt sich kein Zusammenhang herstellen. So wurden der TAS2R16 (Tabelle 8) und der TAS2R50 um ungefähr 15 Prozent blockiert, jedoch war das residuale Fluoreszenzsignal des TAS2R16 ($\Delta F/F = 1,13$; Anhang S.124) im Vergleich zum TAS2R50 ($\Delta F/F = 0,5$) mehr als doppelt so hoch. Des Weiteren wurde TAS2R38 vollständig inhibiert, obwohl das Rezeptorsignal ($\Delta F/F = 0,35$) nur etwas höher war als für den TAS2R10 ($\Delta F/F = 0,22$) und -R14 ($\Delta F/F = 0,25$; Anhang S.123), bei denen das Rezeptorsignal nur auf rund 30 Prozent reduziert wurde (Tabelle 8).

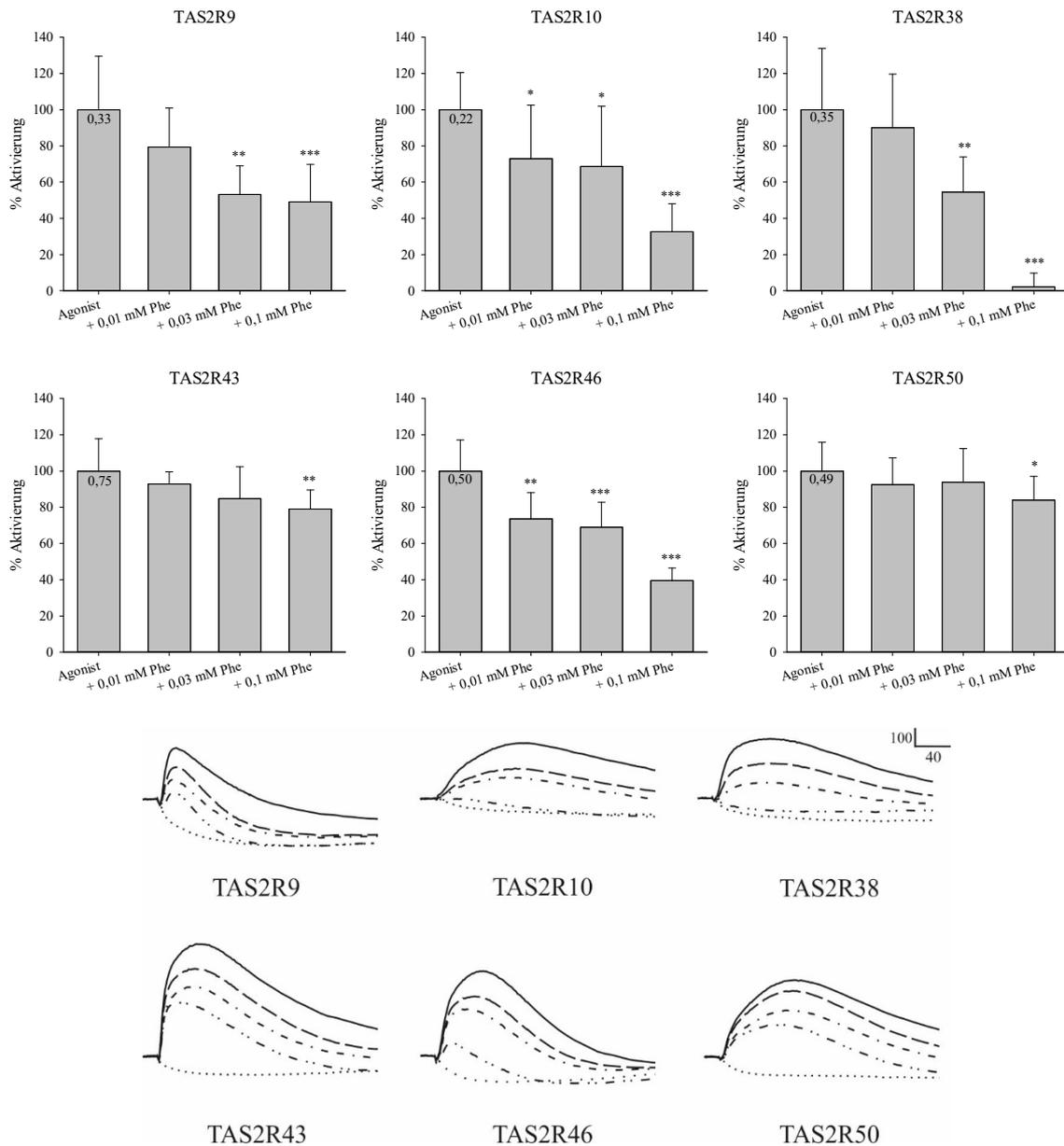


Abbildung 19: Phenanthrolin als breitbandiger Antagonist.

Oben in den Graphen gezeigt sind von links nach rechts jeweils der Agonist (TAS2R9 Pirenzepin 2 mM, TAS2R10 Strychnin 90 μ M, TAS2R38 Phenylthiocarbamid 3 μ M, TAS2R43 Aristolochiasäure 0,3 μ M, TAS2R46 Picrotoxinin 300 μ M, TAS2R50 Andrographolid 100 μ M), allein appliziert gefolgt von simultaner Applikation des Agonisten mit dem Inhibitor in steigender Konzentration (Phe = Phenanthrolin) auf TAS2R-exprimierende Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Das residuale Fluoreszenzsignal des Agonisten allein appliziert ist als Referenzwert über dem Graphen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen aktiviert mit dem Agonisten (—), gefolgt von gleichzeitiger Applikation (Pfeil) des Agonisten und steigenden Konzentrationen Phenanthrolins (niedrigste Konzentration — — —; mittlere Konzentration - - - -; höchste Konzentration - · · -). Die verwendeten Inhibitorkonzentrationen sind den Graphen zu entnehmen. Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und der höchsten Konzentration des Inhibitors sind als Negativkontrolle gezeigt (· · · · ·). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

3.2 Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ausgewählter Antagonisten

In der vorliegenden Arbeit wurden 52 Bitterstoffe als mögliche Antagonisten auf acht Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R9, -R10, -R14, -R16, -R38, -R43, -R46, -R50) getestet. Drei Substanzen stellten sich als breitbandige Inhibitoren heraus, die das Fluoreszenzsignal der TAS2R-exprimierenden Zellen mit den jeweiligen Agonisten von sechs und mehr Bitterrezeptoren reduzierten (Tabelle 8). Um die Potenz der Antagonisten gegenüber den Agonisten der Bittergeschmacksrezeptoren beurteilen zu können, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden die Agonisten in der jeweiligen EC_{50} -Konzentration des TAS2Rs zusammen mit steigenden Konzentrationen des Antagonisten aufgetragen. So konnten die IC_{50} -Werte berechnet werden, welche ähnlich der EC_{50} -Konzentration Aufschluss darüber geben wie hoch die Konzentration des Inhibitors sein muss, um das maximale Rezeptorsignal um 50 Prozent zu inhibieren.

3.2.1 Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Chloroquin

Unter den acht Testrezeptoren befand sich TAS2R10, für den Chloroquin ein bekannter Agonist ist. Somit wurde Chloroquin als Antagonist für sieben TAS2Rs getestet und zeigte eine inhibitorische Wirkung auf sechs Rezeptoren (TAS2R9, -R14, -R16, -R38, -R43, -R46). Nur für TAS2R50 konnte keine Reduktion des Calciumsignals festgestellt werden (Tabelle 8). Für alle sechs Bittergeschmacksrezeptoren die Chloroquin inhibierte wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. In den vorherigen Versuchen wurden die Agonisten in ihren EC_{90} -Konzentrationen verwendet, wobei festgestellt werden konnte, dass Chloroquin TAS2R14 mit seinem Agonisten Picrotoxinin vollständig, alle anderen Rezeptoren um ca. 50 Prozent inhibierte (Tabelle 8). Um die Konzentration-Wirkungsbeziehung zu untersuchen, wurden die Agonisten in der EC_{50} -Konzentration eingesetzt.

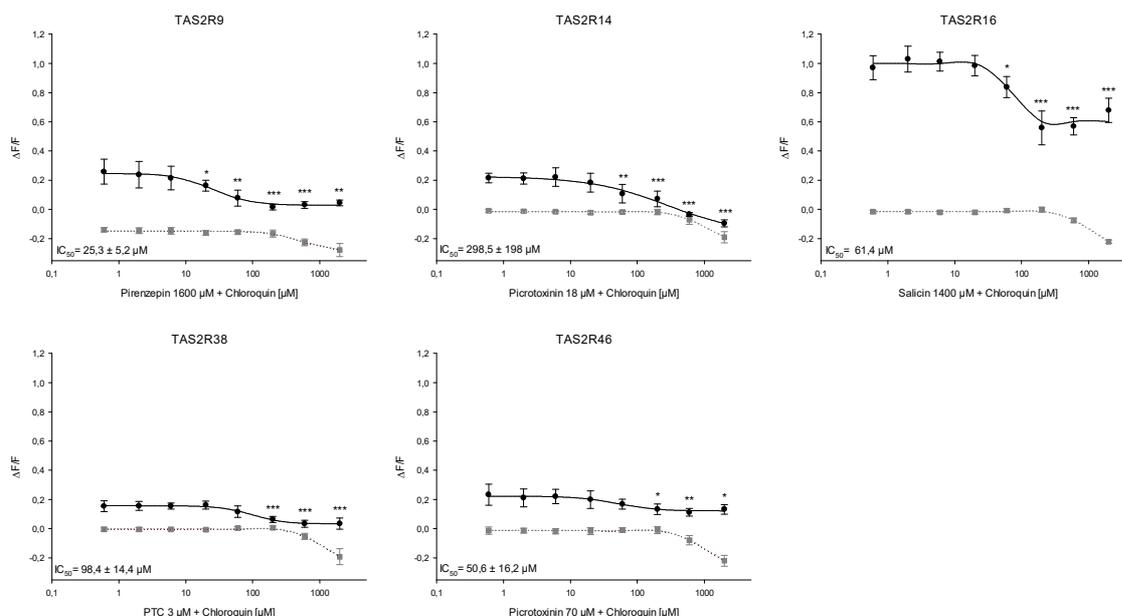


Abbildung 20: Dosis-Wirkungs-Experimente des Antagonisten Chloroquin.

Dargestellt ist die Reduzierung der Calciumsignale der TAS2Rs mit ihren spezifischen Agonisten (TAS2R9 Pirenzepin; -R14 PicROTOXININ; -R16 Salicin; -R38 Phenylthiocarbamid (PTC); -R46 PicROTOXININ) in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Chloroquin (Chloro) auf Rezeptor- (schwarz) und Leervektor-transfizierten (grau) Zellen. Die Agonisten wurden in der jeweiligen EC_{50} -Konzentration verwendet (Pirenzepin auf TAS2R9 Dosis-Wirkungs-Experiment Anhang S.128; Behrens et al., 2014; Bufo et al., 2002; Biarnes et al., 2010; Brockhoff et al., 2007). Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte in SigmaPlot, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass Chloroquin die Calciumsignale von TAS2R9 mit dem Agonisten Pirenzepin, -R14 auf PicROTOXININ und -R38 mit dem Aktivator Phenylthiocarbamid (PTC) vollständig hemmt. Beim Vergleich der IC_{50} -Werte besaß Chloroquin für TAS2R9 mit einem IC_{50} von $25,3 \mu\text{M}$ die höchste Potenz. Der IC_{50} -Wert von TAS2R14 war im Vergleich zu dem von TAS2R9 um ein Vielfaches höher mit $298,5 \mu\text{M}$, wobei die residualen Fluoreszenzwerte (TAS2R9 $\Delta F/F = 0,26$; TAS2R14 $\Delta F/F = 0,21$) bei der Koapplikation der niedrigsten Konzentration von Chloroquin ($0,6 \mu\text{M}$) ähnlich hoch waren. Chloroquin zeigte in hohen Konzentrationen ein negatives, Rezeptor unabhängiges Fluoreszenzsignal. Rief der verwendete Agonist wie zum Beispiel Pirenzepin selbst auch ein negatives Rezeptor unabhängiges Fluoreszenzsignal hervor, vertiefte sich dieses zusätzlich. Zu sehen ist dies an den Leervektor-transfizierten Kontrollzellen (Abbildung 20). Allerdings wurden TAS2R16, -R43 und -R46 trotz des steigenden negativen Artefakts bei höheren Konzentrationen ($0,6 \text{ mM}$ und 2 mM Chloroquin) nicht vollständig inhibiert. Nach der Normierung auf die Leervektor-transfizierten Zellen zeigte das residuale Calciumsignal von TAS2R16 und -R46 keine weitere Abnahme bei den höchsten Konzentrationen von Chloroquin, wobei Chloroquin ein partieller Agonist von TAS2R46 ist (Abbildung 15). Der IC_{50} -Wert von TAS2R16 wurde bei $61,4 \mu\text{M}$ bestimmt und die halbmaximale Inhibition von TAS2R46 erfolgte bei $50,6 \mu\text{M}$

Chloroquin. Für TAS2R16 ließ sich kein verwertbarer Standardfehler berechnen. Die IC_{50} -Werte für TAS2R38 und -R43 (Abbildung 20, 23) liegen zwar nahe beieinander (98,4 bzw. 86,2 μM), jedoch zeigte TAS2R43 mit dem Agonisten Aristolochiasäure bei gleichzeitiger Zugabe von Chloroquin eine Signalniedrigung auf ca. 36 Prozent, wohingegen das Calciumsignal von TAS2R38 wie schon erwähnt vollständig unterdrückt wurde.

3.2.2 Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Phenanthrolin

Phenanthrolin zeigte sich als Inhibitor für alle acht Testrezeptoren (Tabelle 8). Abbildung 21 zeigt, dass bei der Applikation der Agonisten in deren EC_{50} -Konzentration und der simultanen Zugabe von Phenanthrolin das Calciumsignal von vier Bittergeschmacksrezeptoren vollständig inhibiert wurde. Wie schon bei Chloroquin zählen zu diesen Rezeptoren TAS2R14 und -R38. Mit IC_{50} -Werten von 5,8 μM bzw. 3,1 μM ist Phenanthrolin im Vergleich mit Chloroquin der weitaus potentere Antagonist (IC_{50} 298,5 μM bzw. 98,4 μM). Auch bei TAS2R10 und -R46 war bei der Koapplikation der Agonisten und 100 μM bzw. 30 μM Phenanthrolin kein Rezeptorsignal mehr vorhanden, wobei die halbmaximale hemmende Wirkung von TAS2R10 bei 8 μM , von TAS2R46 bei 6,6 μM Phenanthrolin eintrat. Im Vergleich zu Chloroquin zeigte auch Phenanthrolin keine vollständige Inhibition von TAS2R16. Der IC_{50} -Wert des Antagonisten Phenanthrolin auf TAS2R16 war mit 53 μM niedriger als jener von Chloroquin (61,4 μM). Die residualen Fluoreszenzsignale von TAS2R16 ($\Delta F/F = 0,94$) und TAS2R50 ($\Delta F/F = 0,27$), hervorgerufen vom Agonisten und gleichzeitiger Applikation von 0,03 μM Phenanthrolin (100 Prozent), sanken bei der Zugabe von 100 μM Phenanthrolin auf 83 Prozent. Mit 4,3 μM war der IC_{50} -Wert des TAS2R50 um mehr als ein zehnfaches geringer als von TAS2R16 ($IC_{50} = 53 \mu\text{M}$). Anzumerken ist, dass die Signalreduktion von TAS2R50 durch Phenanthrolin auf 83 Prozent statistisch nicht signifikant war. Die Aktivierung von TAS2R9 durch die Koapplikation des Agonisten Pirenzepin und 0,03 μM Phenanthrolin ($\Delta F/F = 0,27$) wurde durch die maximal applizierbare Konzentration von 100 μM Phenanthrolin auf 20 Prozent minimiert. Ein IC_{50} -Wert konnte nicht ermittelt werden.

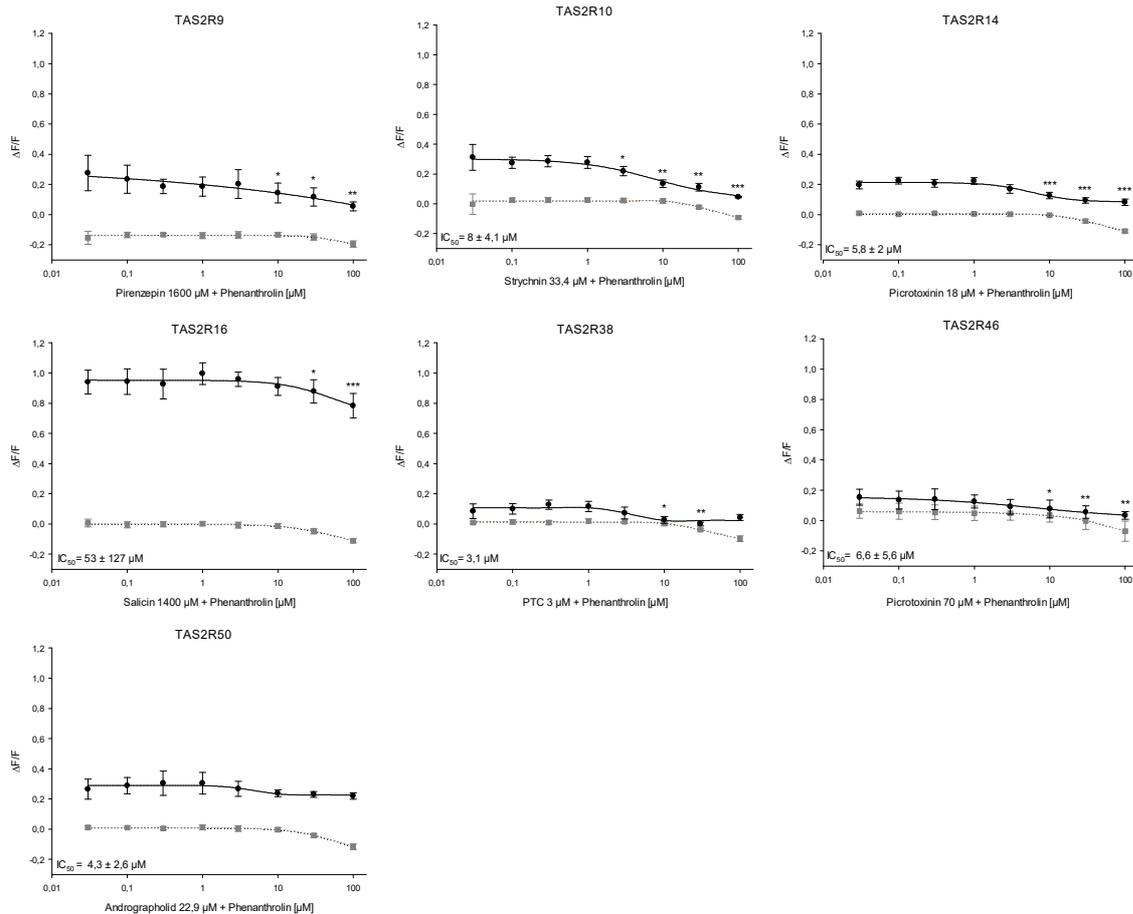


Abbildung 21: Dosis-Wirkungs-Experimente des Antagonisten Phenanthrolin.

Dargestellt ist die Minimierung der Calciumsignale der TAS2Rs mit ihren spezifischen Agonisten (TAS2R9 Pirenzepin; -R10 Strychnin; -R14 Picrotoxinin; -R16 Salicin; -R38 Phenylthiocarbamid (PTC); -R46 Picrotoxinin; -R50 Andrographolid) in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Phenanthrolin (Phen) auf Rezeptor- (schwarz) und Leervektor-transfizierten (grau) Zellen. Die Agonisten wurden in der jeweiligen EC_{50} -Konzentration verwendet (Pirenzepin auf TAS2R9 Dosis-Wirkungs-Experiment im Anhang S.128; Behrens et al., 2009; Behrens et al., 2014; Biarnes et al., 2010; Born et al., 2013; Brockhoff et al., 2007; Bufe et al., 2002). Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte in SigmaPlot, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

3.2.3 Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Allylithiocyanat

Mit Allylithiocyanat (AITC) wurde ein weiterer Bitterstoff gefunden der eine hemmende Wirkung auf mehrere Bittergeschmacksrezeptoren besaß (Tabelle 8). Sieben Rezeptoren (TAS2R9, -R10, -R14, -R16, -R43, -R46, -R50) zeigten ein reduziertes Rezeptorsignal bei der Koapplikation des Agonisten und AITC. Die Calciumspur von TAS2R14 und -R16 hervorgerufen durch den spezifischen Agonisten wurden durch die simultane Zugabe von AITC (1 mM) auf 41 bzw. 47 Prozent minimiert, wobei die Höhe des Agonisten-induzierten TAS2R16-Signals ($\Delta F/F = 1,07$) mehr als doppelt so hoch war wie jenes von TAS2R14

($\Delta F/F = 0,41$) (Abbildung 14 und 15). Um den antagonistischen Effekt von AITC auf diese Rezeptoren weiter zu untersuchen, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt (Abbildung 22). Die ermittelten IC_{50} -Werte lagen bei $136,1 \mu\text{M}$ für TAS2R14 mit dem Agonisten Picrotoxinin und $1106 \mu\text{M}$ für TAS2R16 aktiviert mit Salicin.

Auch mit AITC wurde das Signal von TAS2R16 mit dem spezifischen Agonisten Salicin nur reduziert. Lag der IC_{50} -Wert von Chloroquin und Phenanthrolin für TAS2R16 bei $61,4$ bzw. $53 \mu\text{M}$ so stieg dieser für AITC auf $1106 \mu\text{M}$ (Abbildung 20 und 21).

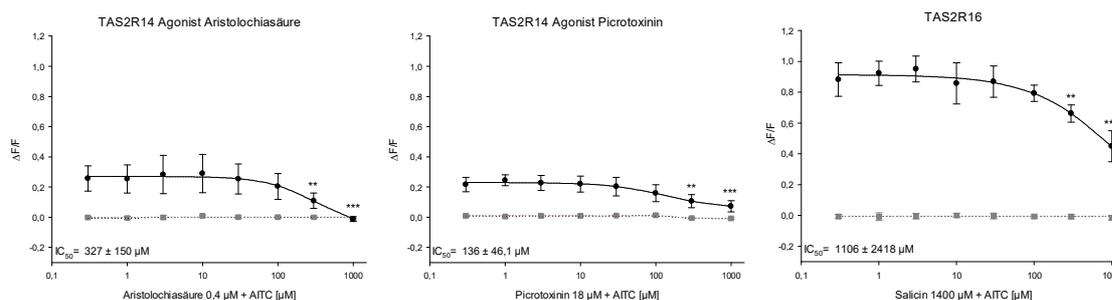


Abbildung 22: Dosis-Wirkungs-Experimente des Antagonisten Allylisothiocyanat.

Dargestellt ist die Minimierung der Calciumsignale der TAS2Rs mit ihren spezifischen Agonisten (TAS2R14 Aristolochiasäure und Picrotoxinin; -R16 Salicin) in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Allylisothiocyanat (AITC) auf Rezeptor- (schwarz) und Leervektor-transfizierten (grau) Zellen. Die Agonisten wurden in der jeweiligen EC_{50} -Konzentration verwendet (TAS2R14 Aristolochiasäure Stefanie Nowak (Dife, Molekulare Genetik); Behrens et al., 2014; Bufe et al., 2002). Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte in Sigma Plot, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$ ***).

Um die Spezifität der Inhibition von AITC auf TAS2R14 zu testen, wurde als weiterer Agonist Aristolochiasäure verwendet. Das Calciumsignal von Aristolochiasäure auf TAS2R14-exprimierenden Zellen, in fast 100fach geringerer Konzentration eingesetzt als Picrotoxinin, wurde von AITC vollständig inhibiert. Es zeigte sich, dass der IC_{50} -Wert von TAS2R14 mit dem Agonisten Aristolochiasäure ($327,6 \mu\text{M}$) mehr als doppelt so hoch war als mit dem Agonisten Picrotoxinin ($136,1 \mu\text{M}$). Ausgehend von einer initialen TAS2R14-Signalhöhe von $\Delta F/F = 0,26$ bei der Aktivierung mit Aristolochiasäure und einem maximalen Rezeptorsignal von $\Delta F/F = 0,22$ bei der Applikation des Agonisten Picrotoxinin.

3.2.4 Dosis-Wirkungs-Experimente von Antagonisten des TAS2R43

Um die Wirkung der Antagonist-Agonisten-Paare für TAS2R43 zu untersuchen, wurde für diesen Rezeptor nicht nur die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der breitbandigen Antagonisten Allylthiocyanat, Chloroquin und Phenanthrolin untersucht, sondern auch für Yohimbin. Als einziger der Antagonisten inhibierte Yohimbin das Calciumsignal von TAS2R43-exprimierenden Zellen mit dem Agonisten Aristolochiasäure vollständig (siehe auch Abbildung 13 und Tabelle 8) und besaß somit die höchste Effektivität als Inhibitor.

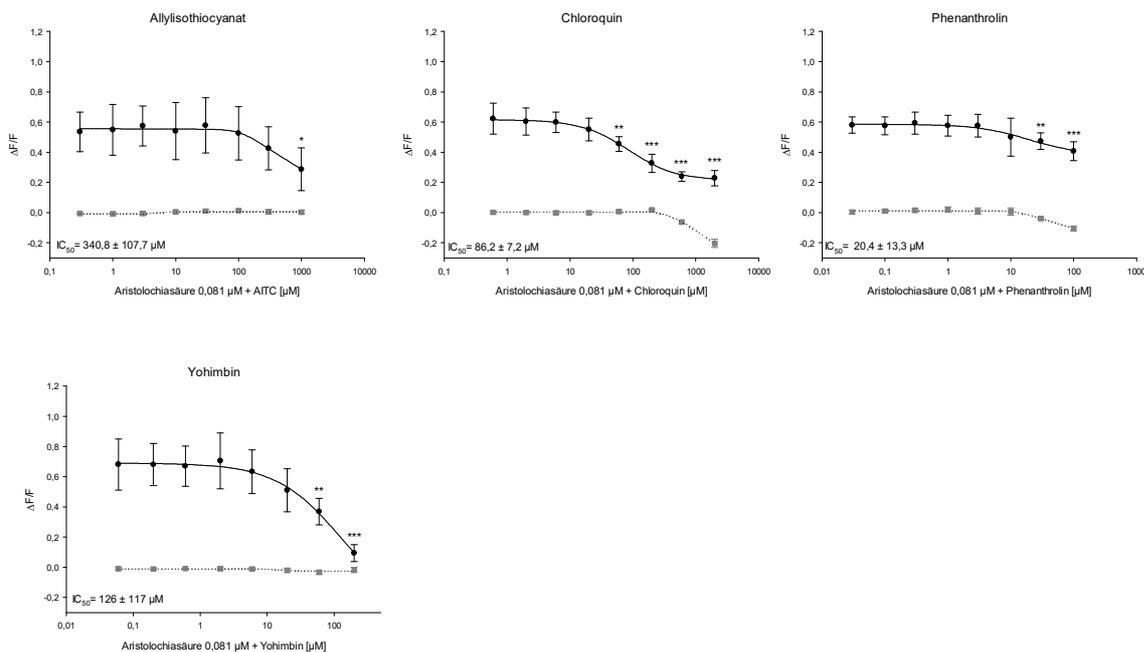


Abbildung 23: Dosis-Wirkungs-Experimente des TAS2R43 mit verschiedenen Antagonisten.

Dargestellt ist die Minimierung der Calciumsignale der TAS2Rs mit dem Agonisten Aristolochiasäure in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Antagonisten Allylthiocyanat (AITC), Chloroquin (Chloro), Phenanthrolin (Phen) und Yohimbin auf Rezeptor- (schwarz) und Leervektor-transfizierten (grau) Zellen. Der Agonist Picrotoxinin wurde in seiner EC_{50} -Konzentration verwendet (0,081 µM, Kuhn et al., 2004). Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte in Sigma Plot, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Beim Vergleich der Antagonisten untereinander zeigte sich, dass jeder Antagonist von TAS2R43 auf Aristolochiasäure mit unterschiedlicher Potenz und Effizienz wirkte. So reduzierte Chloroquin das anfängliche Rezeptorsignal auf ca. 37 Prozent mit einem IC_{50} -Wert von 86,2 µM, AITC auf rund 54 Prozent (IC_{50} 340,8 µM) und Phenanthrolin auf nur 70 Prozent (IC_{50} 20,4 µM). Somit wirkte Phenanthrolin mit dem niedrigsten IC_{50} -Wert als potentester Inhibitor auf TAS2R43 aktiviert mit Aristolochiasäure.

3.3 Charakterisierung des Inhibitionsmodus von TAS2R-Antagonisten

Der Inhibition von Rezeptoren liegen verschiedene molekulare Mechanismen zugrunde. Zum einen der orthosterische Antagonismus bei dem der Antagonist den Zugang zum Rezeptor für den Agonisten versperrt. Hier konkurrieren der Agonist und der Antagonist um die gleiche Bindungstasche. Zum anderen gibt es den allosterischen Antagonismus, bei dem der Antagonist eine eigene Bindungsstelle am Rezeptor besitzt und durch eine Änderung der Rezeptorkonformation die Bindung des Agonisten verhindert. Dies kann zu einer veränderten Effizienz und Affinität des Agonisten zum Rezeptor führen.

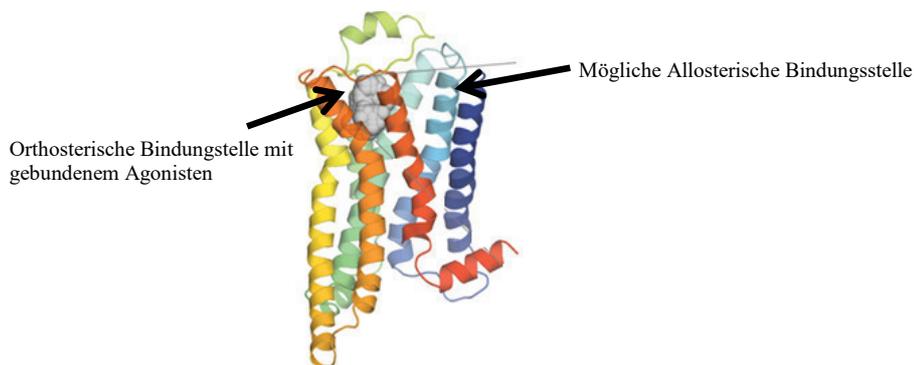


Abbildung 24: TAS2R10 mit gebundenem Agonist an der orthosterischen Bindungsstelle (modifiziert nach Born et al., 2013). Liganden die nicht in der Agonistenbindungstasche, sondern an einer eigenen Bindungsstelle wirken, werden als allosterische Modulatoren bezeichnet. Die sieben Transmembrandomänen sind farblich dargestellt vom N-Terminus (blau) bis zum C-Terminus (rot) und durch extra- (oben) und intrazelluläre (unten) Schleifen verbunden.

Abhängig von der Kinetik des Systems kann es sich um eine überwindbare (*surmountable*) oder eine unüberwindbare (*insurmountable*) Inhibition handeln. Ist die Inhibition *surmountable* verschiebt sich bei der Zugabe steigender Konzentrationen des Inhibitors die Dosis-Wirkungskurve nach rechts ohne das eine Reduktion des maximalen Rezeptorsignals erfolgt. Als *insurmountable* Antagonisten werden Modulatoren bezeichnet, welche durch steigende Konzentrationen zu einer Abnahme des Rezeptorsignals führen (Gaddum, 1957).

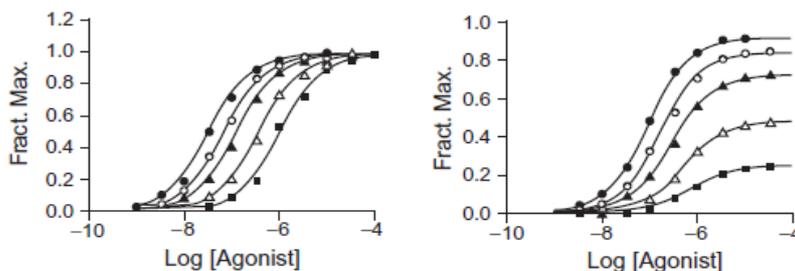


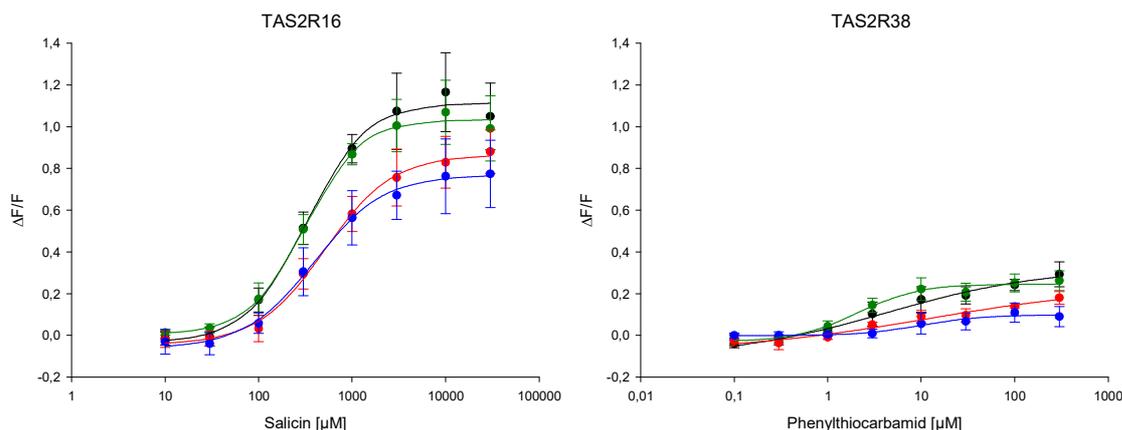
Abbildung 25: Mögliche Auswirkungen eines Antagonisten auf die Dosis-Wirkungs-Kurve eines Rezeptors unter verschiedenen kinetischen Bedingungen (modifiziert nach Kenakin, 2009).

Ansteigende Konzentrationen des Antagonisten führen A) zu einem Anstieg der EC_{50} -Werte, wobei das Maximalsignal des Rezeptors sich nicht verändert (*surmountable*) oder B) zu einer Reduktion des Rezeptorsignals und einem Anstieg der EC_{50} -Werte (*insurmountable*). Dargestellt sind Dosis-Wirkungs-Experimente in Abwesenheit des Antagonisten (●) und mit steigender Konzentration des Antagonisten (von ○ bis ■).

Dabei kann mehr als ein molekularer Mechanismus die oben abgebildeten Eigenschaften hervorrufen (Abbildung 25). Zum Beispiel kann ein allosterischer Antagonist überwindbare und nicht-überwindbare Effekte auf Rezeptoren haben abhängig von dem System, in dem er wirkt. Des Weiteren ist es möglich, dass ein allosterischer Ligand zur Inhibition des Rezeptors bei einem Agonisten führt und bei einem anderen Agonisten zu einem Anstieg der Rezeptoraktivität. Allosterische Antagonisten besitzen im Gegensatz zu orthosterischen Modulatoren die Eigenschaft für jeden Rezeptoragonisten eine spezifische Wirkung zu haben (Kenakin et al., 2006).

3.3.1 Inhibitionsmodus von Chloroquin

In der vorliegenden Arbeit wurde Chloroquin von sieben getesteten Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R9, -R14, -R16, -R38, -R43, -R46, -R50) als Antagonist für sechs TAS2Rs identifiziert (Tabelle 8). Um den Inhibitionsmodus zu charakterisieren, wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt in dem TAS2R16 und -R38 mit den jeweiligen Agonisten in steigenden Konzentrationen bis hin zur maximal möglichen Konzentration aktiviert wurden. Um die Auswirkungen auf die Rezeptoraktivierung zu untersuchen, wurde der Antagonist Chloroquin in drei verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und die Dosis-Wirkungs-Kurven in Abwesenheit und Anwesenheit des Inhibitors verglichen.



Antagonist Chloroquin (μM)	TAS2R16 Agonist Salicin		TAS2R38 Agonist PTC	
	EC ₅₀ (μM)	ΔF/F max	EC ₅₀ (μM)	ΔF/F max
0	323 ± 41	1,05 ± 0,16	4,4 ± 2,5	0,29 ± 0,06
20	311,1 ± 26,8	0,99 ± 0,16	2,1 ± 0,5	0,26 ± 0,05
200	512 ± 53,6	0,88 ± 0,1*	11,6 ± 17,5	0,18 ± 0,03**
2000	394,3 ± 41,1	0,77 ± 0,16**	10,2 ± 3,8	0,09 ± 0,05***

Abbildung 26: Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Chloroquin.

Die Agonisten des TAS2R16 (Salicin) und des TAS2R38 (Phenylthiocarbamid (PTC)) wurden in steigenden bis zur maximal applizierbaren Konzentrationen (Salicin 30 mM (Reichling et al., 2008), Phenylthiocarbamid 300 μM (Biarnes et al., 2010)) auf die Rezeptor-exprimierenden Zellen gegeben. Der Antagonist wurde in verschiedenen Konzentrationen (0 μM schwarz, 20 μM grün, 200 μM rot, 2000 μM blau) mit allen Konzentrationen des Agonisten vermessen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die EC₅₀-Werte wurden berechnet in SigmaPlot. Die statistische Signifikanz der maximalen Calciumsignale ohne Antagonist gegen die Maximalsignale mit Antagonist wurden mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

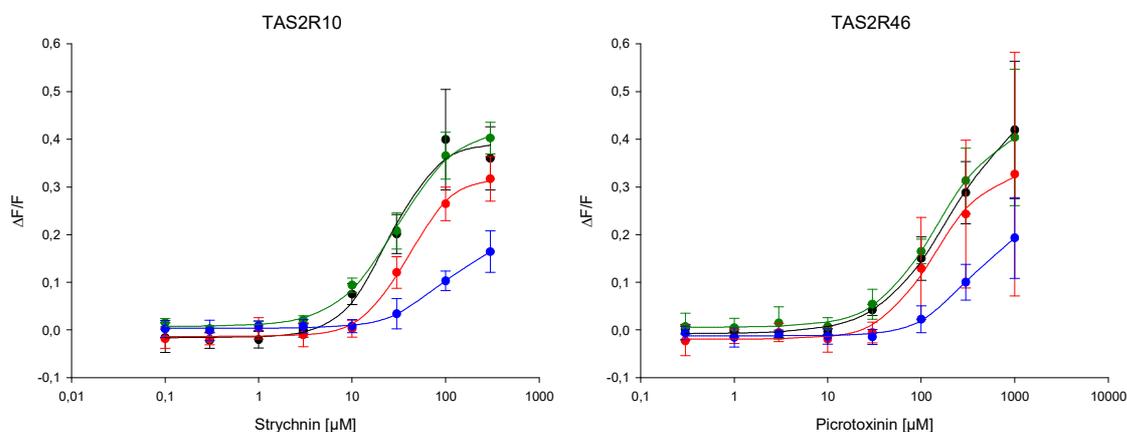
In Abwesenheit des Antagonisten war das maximale Rezeptorsignal von TAS2R16 mit dem aktivierenden Bitterstoff Salicin ($\Delta F/F = 1,05$) mehr als dreimal höher als das Calciumsignal von TAS2R38 hervorgerufen von Phenylthiocarbamid ($\Delta F/F = 0,29$). Mit steigender Konzentration von Chloroquin reduzierte sich das maximale Rezeptorsignal des TAS2R16 von $\Delta F/F = 1,05$ (30 mM Salicin + 0 μM Chloroquin) auf $\Delta F/F = 0,77$ (30 mM Salicin + 2 mM Chloroquin). Wobei es ab einer Konzentration von 200 μM Chloroquin zu einer dextralen Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve kam. Ohne die Zugabe von Chloroquin lag der EC₅₀-Wert von TAS2R16 mit Salicin bei 323 μM, durch die simultane Applikation von 200 μM Chloroquin stieg dieser auf 512 μM und bei der Zugabe von 2 mM Chloroquin auf 394,3 μM an.

Das maximale Fluoreszenzsignal von TAS2R38 mit 300 μM PTC in Abwesenheit des Inhibitors von 0,29 $\Delta F/F$ minimierte sich auf 0,09 $\Delta F/F$ bei der Koapplikation von 300 μM PTC und 2 mM Chloroquin auf die Rezeptor-transfizierte Zellen. Wie beim TAS2R16 beobachtet führte die Applikation von 200 μM und 2 mM Chloroquin zu einem Anstieg des EC₅₀-Wertes.

In Abwesenheit des Antagonisten konnte ein EC_{50} -Wert von $4,4 \mu\text{M}$ PTC festgestellt werden, welcher sich durch die Zugabe von $200 \mu\text{M}$ Chloroquin auf $11,6 \mu\text{M}$ bzw. auf $10,2 \mu\text{M}$ für 2 mM Chloroquin erhöhte.

3.3.2 Inhibitionsmodus von Phenanthrolin

Nachdem Phenanthrolin auf alle acht getesteten Rezeptoren eine hemmende Wirkung zeigte (Abbildung 19 und Tabelle 8), wurden auch für diesen breitbandigen Antagonisten Dosis-Wirkungs-Experimente für zwei Rezeptoren (TAS2R10 und -R46) durchgeführt (Abbildung 27).



Antagonist Phenanthrolin (μM)	TAS2R10 Agonist Strychnin		TAS2R46 Agonist Picrotoxinin	
	EC_{50} (μM)	$\Delta F/F$ max	EC_{50} (μM)	$\Delta F/F$ max
0	$24,5 \pm 4,7$	$0,36 \pm 0,07$	$204,3 \pm 28,1$	$0,42 \pm 0,14$
1	$29,9 \pm 2,7$	$0,40 \pm 0,03$	$148,9 \pm 10,1$	$0,40 \pm 0,14$
10	39 ± 4	$0,31 \pm 0,05$	$138,4 \pm 20,4$	$0,33 \pm 0,26$
100	$93 \pm 11,9$	$0,16 \pm 0,04^{***}$	$314,8 \pm 43,8$	$0,19 \pm 0,08^{**}$

Abbildung 27: Dosis-Wirkungs-Experimente mit dem Antagonisten Phenanthrolin.

Die Agonisten des TAS2R10 (Strychnin) und des TAS2R46 (Picrotoxinin) wurden in steigenden bis zur maximal applizierbaren Konzentrationen (Strychnin $300 \mu\text{M}$ (Born et al., 2013); Picrotoxinin 1 mM (Brockhoff et al., 2007)) auf die Rezeptor-exprimierenden Zellen gegeben. Der Antagonist wurde in verschiedenen Konzentrationen ($0 \mu\text{M}$ schwarz, $1 \mu\text{M}$ grün, $10 \mu\text{M}$ rot, $100 \mu\text{M}$ blau) mit allen Konzentrationen des Agonisten vermessen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die EC_{50} -Werte wurden berechnet in SigmaPlot. Die statistische Signifikanz der maximalen Calciumsignale ohne Antagonist gegen die Maximalsignale mit Antagonist wurden mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Das maximale Fluoreszenzsignal von Strychnin am TAS2R10 in Abwesenheit von Phenanthrolin erreichte $0,36 \Delta F/F$. Bei der Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Phenanthrolin reduzierte sich

das Maximalsignal auf $0,32 \Delta F/F$ und sank bei simultaner Applikation von $100 \mu\text{M}$ des Antagonisten weiter auf $0,16 \Delta F/F$. Im Gegensatz dazu stiegen die EC_{50} -Werte mit der Zugabe steigender Konzentrationen von Phenanthrolin stetig an. So vervierfachte sich nahezu der EC_{50} -Wert von $24,5 \mu\text{M}$ in Abwesenheit des Inhibitors auf $93 \mu\text{M}$ bei gleichzeitiger Applikation von Strychnin und $100 \mu\text{M}$ Phenanthrolin.

Auch beim TAS2R46 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Calciumsignale bei der Applikation von 1 mM Picrotoxinin von $0,42 \Delta F/F$ auf $0,19 \Delta F/F$ bei der simultanen Zugabe von 1 mM Picrotoxinin und $100 \mu\text{M}$ Phenanthrolin. Bei der Zugabe von $1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ Phenanthrolin wurden niedrigere EC_{50} -Werte ermittelt ($148,9$ bzw. $138,4 \mu\text{M}$), die jedoch nicht statistisch signifikant waren, als bei der alleinigen Applikation von Picrotoxinin (EC_{50} -Wert $204,3 \mu\text{M}$). Eine dextrale Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte sich bei der Verwendung von $100 \mu\text{M}$ Phenanthrolin mit einem Anstieg des EC_{50} auf $314,8 \mu\text{M}$. Die maximalen Rezeptorsignale hervorgerufen durch die Agonisten wurden sowohl beim TAS2R10 als auch beim TAS2R46 durch die Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Phenanthrolin ungefähr halbiert (von $0,36 \Delta F/F$ auf $0,16 \Delta F/F$ bzw. von $0,42 \Delta F/F$ auf $0,19 \Delta F/F$).

3.4 Charakterisierung des Inhibitors FL101237

Auf der Suche nach Inhibitoren wurde von dem Kooperationspartner Givaudan eine Substanz gefunden die sieben von insgesamt acht getesteten humanen Bittergeschmacksrezeptoren in funktionellen Calcium-Messungen inhibierte (Korrespondenz Jay Slack, Givaudan). Die chemische Struktur der Substanz FL101237 (Hardwickische Säure) ist in Abbildung 28 dargestellt. Das Diterpen kommt zum Beispiel in der Pflanze *Croton sonderianus* vor, welche zu der großen Pflanzenfamilie der Wolfsmilchgewächse zählt und heimisch ist in Südamerika (McChesney und Clark, 1991).

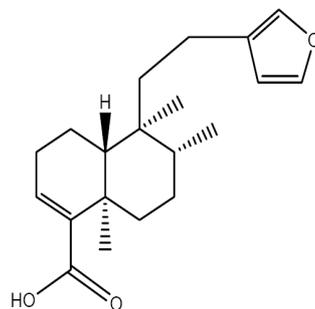


Abbildung 28: Chemische Struktur von FL101237.

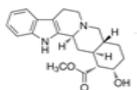
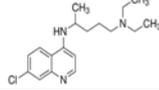
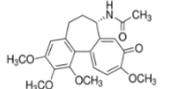
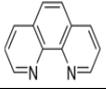
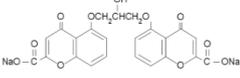
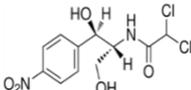
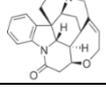
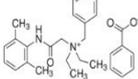
In der vorliegenden Arbeit sollte die Substanz FL101237 auf deren Potential als breitbandiger Inhibitor weiter untersucht werden und wurde daher auf alle 21 deorphanisierten Bittergeschmacksrezeptoren getestet.

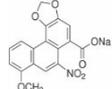
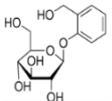
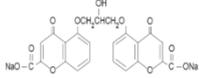
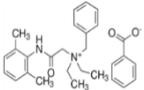
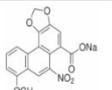
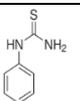
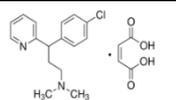
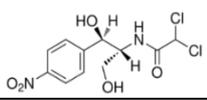
3.4.1 FL101237 als breitbandiger TAS2R-Inhibitor

Um FL101237 als möglichen Antagonisten von Bittergeschmacksrezeptoren zu prüfen, wurden diese mit den unten aufgelisteten Agonisten (Tabelle 9) im heterologen Expressionssystem aktiviert. Durch simultane Applikation von FL101237 und den Agonisten konnten die Calciumspuren der TAS2R-exprimierenden Zellen verglichen werden. Um das Potential von FL101237 als Antagonist zu bestimmen, wurde eine möglichst hohe Konzentration (30 μM) verwendet. Diese lag sehr nahe an der Artefakt-freien Grenze und führte teilweise zu einem Calciumanstieg in den Leervektor-transfizierten Zellen.

Tabelle 9: Bittergeschmacksrezeptoren und deren Agonisten.

Aufgeführt sind alle deorphanisierten TAS2Rs mit den verwendeten Agonisten, deren Konzentration, der Substanzklasse, dem Ursprung (S = synthetische Verbindung, N = natürlich vorkommende Verbindung) und der chemischen Struktur (PubChem, Hersteller) der Agonisten. Die Agonisten der Rezeptoren TAS2R1, -R3, -R4, -R5, -R7, -R8, -R9, -R13, -R30, -R40 wurden aufgrund der geringen Potenz in der maximal applizierbaren Konzentration verwendet. Alle weiteren wurden in der EC_{90} -Konzentration eingesetzt (Brockhoff et al., 2011; Dotson et al., 2008; Meyerhof et al., 2010a; Thalmann et al., 2013; Slack et al., 2010).

TAS2R-	Agonist	Konzentration (mM)	Substanzklasse	Ursprung	chemische Struktur
1	Yohimbin Hydrochlorid	0.2	Alkaloid	N	
3	Chloroquin Disphosphat	2	Aminoquinolin	S	
4	Colchicin	3	Alkaloid	N	
5	1,10-Phenanthrolin Monohydrat	0.3	Phenanthren	S	
7	Cromolyn Natriumsalz	10	Pyran	S	
8	Chloramphenicol	1	Glycol	N	
9	Pirenzepin Dihydrochlorid	2	Benzodiazepin	S	
10	Strychnin Nitratsalz	0.09	Alkaloid	N	
13	Denatoniumbenzoat	3	Sulfonamid	S	

TAS2R-	Agonist	Konzentration (mM)	Substanzklasse	Ursprung	chemische Struktur
14	Aristolochiasäure I Natriumsalz	0.003	Alkaloid	N	
16	D-(-)-Salicin	3	Glucosid	N	
20	Cromolyn Natriumsalz	1	Pyran	S	
30	Denatoniumbenzoat	1	Sulfonamid	S	
31	Aristolochiasäure I Natriumsalz	0.003	Alkaloid	N	
38	Phenylthiocarbamid	0.03	Thiourea	S	
39	(-)-Epigallocatechin-gallat	0.03	Pyran	N	
40	Chlorpheniraminmaleat	0.1	Pyridin	S	
41	Chloramphenicol	1	Glycol	N	
43	Aristolochiasäure I Natriumsalz	0.0003	Alkaloid	N	
46	Picrotoxinin	0.3	Cyclohexan	N	
50	Andrographolid	0.1	Diterpenoid	N	

Von insgesamt 21 Bittergeschmacksrezeptoren konnte für 19 TAS2Rs eine inhibitorische Wirkung durch FL101237 festgestellt werden. Wobei für TAS2R3 und -R8 keine statistische Signifikanz der Inhibition vorlag, da aber in den Einzelexperimenten jeweils eine Hemmung des Rezeptorsignals beobachtet werden konnte, wurden auch diese Rezeptoren zu den inhibierten gezählt. Im Detail konnte durch die Zugabe von FL101237 das Fluoreszenzsignal hervorgerufen durch den Agonisten von elf TAS2R vollständig gehemmt werden, von acht TAS2Rs wurden die Calciumspuren reduziert. Auf TAS2R1 und -R5 wirkte FL101237 nicht als Antagonist, wie im Folgenden noch gezeigt wird (Abbildung 31) stellte sich die Substanz als Agonist von TAS2R1 heraus.

Abbildung 29 zeigt eine Auswahl von sechs Bittergeschmacksrezeptoren deren Agonisten abhängiges Calciumsignal durch die Zugabe von FL101237 vollständig inhibiert wurde. Alle Graphen mit den Kontrollen der Leervektor-transfizierten Zellen befinden sich im Anhang. Es zeigte sich, dass FL101237 mit unterschiedlicher Potenz auf die Bittergeschmacksrezeptoren wirkte. So war es möglich die Calciumausschüttung von acht Rezeptoren (TAS2R10, -R14, -R20, -R31, -R38, -R41, -R50) ab der Zugabe von 30 μM FL101237 komplett zu inhibieren. Anzumerken ist, dass TAS2R14 nicht bei allen Experimenten eine vollständige Inhibition des Rezeptorsignals zeigte, sondern teilweise ein minimales Fluoreszenzsignal vorhanden war. Da aber in über 60 Prozent der Versuche das Agonisten-induzierte Signal nicht mehr nachweisbar war wurde auch TAS2R14 in die Liste der vollständig inhibierten Rezeptoren aufgenommen. Beim TAS2R4 und -R30 konnte bereits ab der Zugabe von 10 μM FL101237 kein Signal mehr beobachtet werden. Am potentesten wirkte der Antagonist auf TAS2R40, bereits beim Applizieren von 3 μM FL101237 konnte der Agonist Chlorpheniramin den Rezeptor nicht mehr aktivieren. Das Agonisten-induzierte maximale Rezeptorsignal von TAS2R40 lag bei $\Delta F/F = 0,16$. Das Maximalsignal von TAS2R30, vollständig inhibiert ab 10 μM FL101237, war mit $\Delta F/F = 0,08$ zweimal geringer (Anhang S.132). Auch TAS2R4 zeigte bei simultaner Applikation des Agonisten und 10 μM FL101237 kein Signal, wobei das Fluoreszenzsignal ohne FL101237 eine Höhe von $\Delta F/F=0,21$ besaß. TAS2R7, -R10, -R31 und R50 zeigten ab einer Konzentration von 30 μM FL101237 kein Rezeptorsignal mehr. Die Höhe der Agonisten-induzierten Calciumspur auf Rezeptor-exprimierenden Zellen war für TAS2R7 ($\Delta F/F = 0,25$), -R10 ($\Delta F/F = 0,29$), und -R31 ($\Delta F/F = 0,28$) ähnlich; TAS2R50 zeigte ein höheres Ausgangssignal ($\Delta F/F = 0,47$) (Abbildung 29).

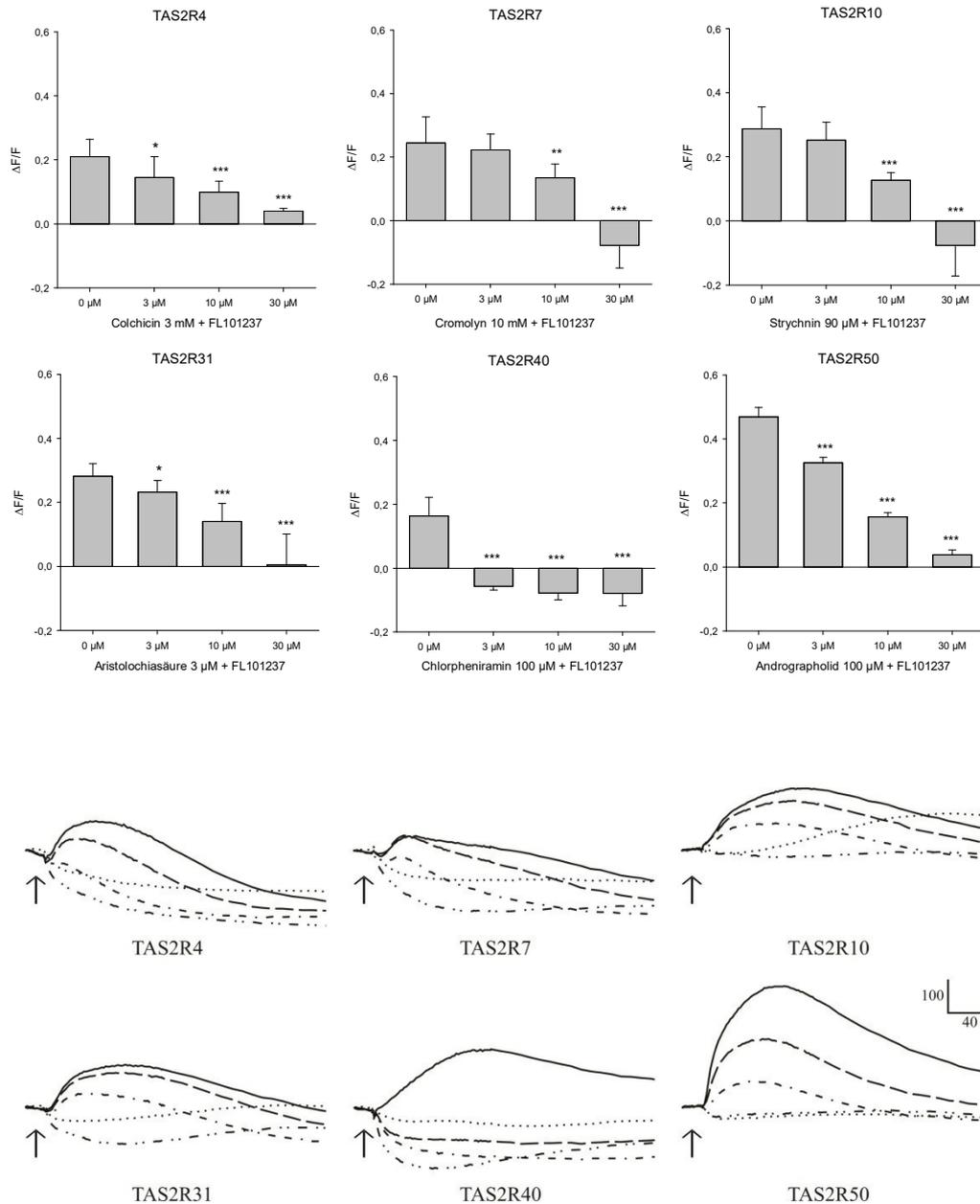


Abbildung 29: Bittergeschmacksrezeptoren, welche durch FL101237 vollständig inhibiert werden.

Oben dargestellt sind die residualen Fluoreszenzsignale der TAS2R-transfizierten Zellen, aktiviert mit den Agonisten (TAS2R4 Colchicin 3 mM, TAS2R7 Cromolyn 10 mM; TAS2R10 Strychnin 90 μM ; TAS2R31 Aristolochiasäure 3 μM ; TAS2R40 Chlorpheniramin 100 μM ; TAS2R50 Andrographolid 100 μM) in Abwesenheit und Anwesenheit steigender Konzentrationen von FL101237 (3; 10; 30 μM), $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumspuren der Rezeptor-transfizierten Zellen bei der Applikation (Pfeil) des Agonisten (—), gefolgt von gleichzeitiger Zugabe des Agonisten und steigenden Konzentrationen von FL101237 (3 μM - - - ; 10 μM - · - · - ; 30 μM - · · · -). Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und 30 μM FL101237 sind als Negativkontrolle gezeigt (·····). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

Für acht Bittergeschmacksrezeptoren konnte auch bei der Zugabe von 30 μM FL101237 keine vollständige Inhibition des Agonisten-induzierten Rezeptorsignals festgestellt werden. Das Fluoreszenzsignal von TAS2R3, -R8 und -R9 wurde um 29, 22 bzw. 27 Prozent reduziert, wobei die Höhe des residualen Calciumsignals hervorgerufen durch die alleinige Applikation des Agonisten bei 0,09 $\Delta\text{F}/\text{F}$, 0,26 $\Delta\text{F}/\text{F}$ bzw. 0,45 $\Delta\text{F}/\text{F}$ lag (Anhang S.130). Die Calciumspur von TAS2R13 konnte durch die simultane Applikation von 30 μM FL101237 auf 46 Prozent, die von TAS2R16 auf 42 Prozent reduziert werden. Mit einem maximalen Rezeptorsignal von 1,04 $\Delta\text{F}/\text{F}$ zeigte TAS2R16 ein mehr als fünfmal höheres Fluoreszenzsignal als TAS2R13 (0,19 $\Delta\text{F}/\text{F}$) (Anhang S.131). Beispiele für Bittergeschmacksrezeptoren deren Agonisten-abhängige Aktivierung durch die Zugabe von FL101237 reduziert wurden, sind in Abbildung 30 gezeigt.

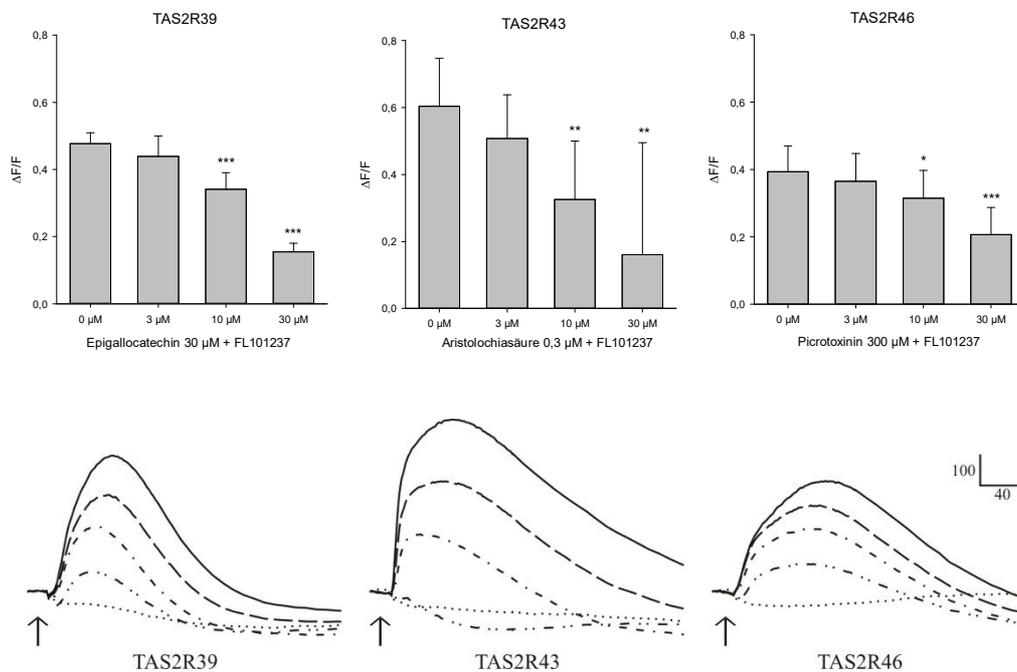


Abbildung 30: Bittergeschmacksrezeptoren, welche durch FL101237 nicht vollständig gehemmt werden.

Oben dargestellt sind die residualen Fluoreszenzsignale der TAS2R-transfizierten Zellen, aktiviert mit den Agonisten (TAS2R39 Epigallocatechingallat 30 μM ; TAS2R43 Aristolochiasäure 0,3 μM ; TAS2R46 Picrotoxinin 300 μM) in Abwesenheit und Anwesenheit steigender Konzentrationen von FL101237 (3; 10; 30 μM), $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Unten dargestellt sind die Calciumspuren der Rezeptor-transfizierten Zellen bei der Applikation (Pfeil) des Agonisten (—), gefolgt von gleichzeitiger Zugabe des Agonisten und steigenden Konzentrationen von FL101237 (3 μM — — — ; 10 μM - - - - ; 30 μM - · · -). Die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit dem Agonisten und 30 μM FL101237 sind als Negativkontrolle gezeigt (·····). Die Skala entspricht $y = 100$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

In Abwesenheit des Antagonisten zeigten die Rezeptoren TAS2R39, -R43 und -R46 ein residuales Fluoreszenzsignal von 0,48 $\Delta F/F$, 0,6 $\Delta F/F$ bzw. 0,39 $\Delta F/F$ (Abbildung 30). Am stärksten inhibiert, auf 27 Prozent, wurde das Rezeptorsignal von TAS2R43 durch die Zugabe von 30 μM FL101237. Das Agonisten-induzierte Calciumsignal von TAS2R39 wurde durch die gleichzeitige Applikation von 30 μM des Antagonisten auf 33 Prozent minimiert. Weniger potent zeigte sich FL101237 auf TAS2R46 mit einer Inhibitionsstärke auf 53 Prozent des Fluoreszenzsignals (Abbildung 30).

Anzumerken ist, dass einige Rezeptoren mit den gleichen Agonisten aktiviert wurden. So wurde für TAS2R7 und -R20 Cromolyn als Agonist verwendet (10 mM bzw. 1 mM), wobei beide Rezeptoren von 30 μM FL101237 nicht mehr durch den Agonisten aktiviert werden konnten (Tabelle 9, Abbildung 29 und Anhang S.130, 132). Chloramphenicol wurde in einer Konzentration von 1 mM für TAS2R8 und -R41 eingesetzt. Das Chloramphenicol-induzierte TAS2R8-Signal wurde auf 78 Prozent reduziert, wohingegen TAS2R41 bei 30 μM FL101237 kein residuales Fluoreszenzsignal mehr zeigte (Tabelle 9, Anhang S.130, 133). Ähnliches galt auch für TAS2R13 und -R30 mit dem Agonisten Denatoniumbenzoat, eingesetzt in einer Konzentration von 3 bzw. 1 mM. Das Denatoniumbenzoat-induzierte Signal auf den Rezeptor-transfizierten Zellen wurde beim TAS2R13 durch die Zugabe von 30 μM FL101237 auf 46 Prozent reduziert, während das TAS2R30-Signal ab 10 μM FL101237 vollständig gehemmt werden konnte. Der Bitterstoff Aristolochiasäure wurde für drei Bittergeschmacksrezeptoren (TAS2R14, -R31, -R43) als aktivierende Substanz verwendet. Für TAS2R14 und -R31 wurden 3 μM Aristolochiasäure für die Calcium-Messungen eingesetzt mit einem daraus resultierenden Maximalsignal von 0,68 bzw. 0,28 $\Delta F/F$. Eine vollständige Inhibition des Calciumsignals konnte ab einer Zugabe von 30 μM erzielt werden. TAS2R43 wurde mit einer 10fach geringeren Menge an Aristolochiasäure aktiviert (0,3 μM), welches zu einem residualen Fluoreszenzsignal von 0,6 $\Delta F/F$ führte. Durch die gleichzeitige Applikation von 30 μM FL101237 wurde das Signal auf 27 Prozent minimiert.

3.4.2 FL101237 als Bittergeschmacksrezeptoragonist

In sensorischen Studien der Kooperationsfirma Givaudan wurde FL101237 als leicht bitter schmeckend bezeichnet (Korrespondenz Jay Slack, Givaudan). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit experimentell belegt werden. FL101237 wurde auf alle 25 Bittergeschmacksrezeptoren als Agonist getestet und aktivierte die Calcium-Ausschüttung bei TAS2R1- und TAS2R46-exprimierenden Zellen.

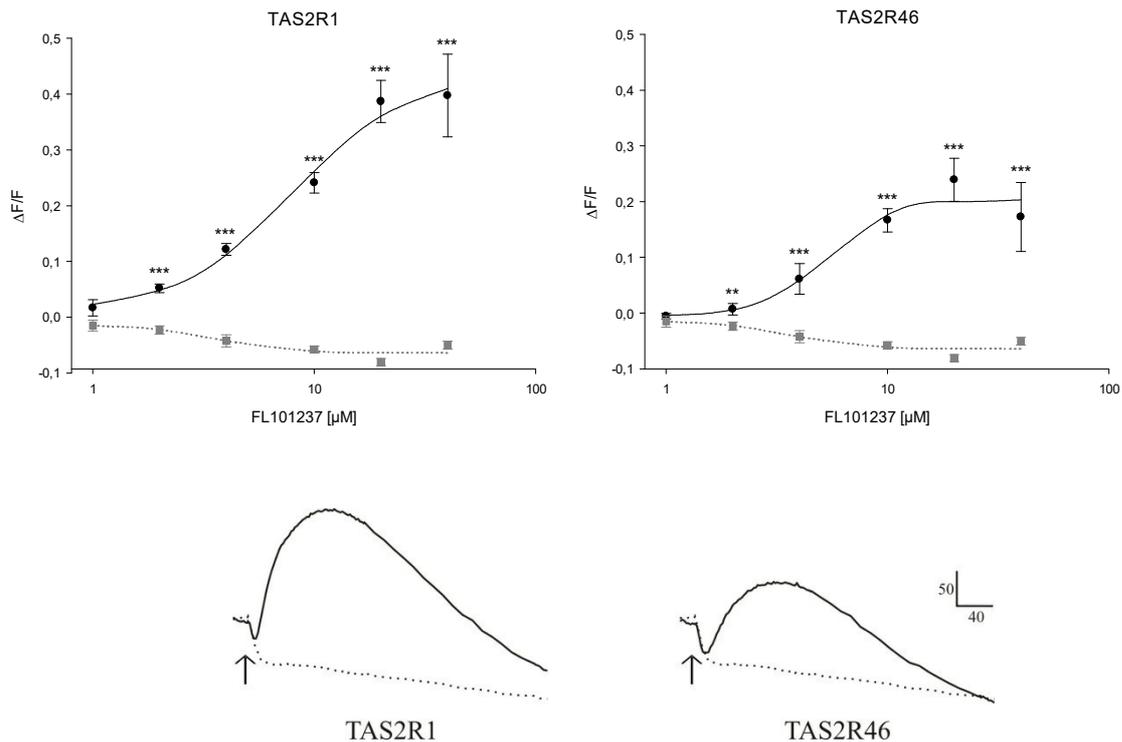


Abbildung 31: FL101237 als Agonist.

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Experimente von FL101237 als Agonist von TAS2R1 (EC_{50} $8,1 \pm 1,8 \mu\text{M}$) und als partieller Agonist von TAS2R46 (EC_{50} $5,3 \pm 1,7 \mu\text{M}$) auf Rezeptor- (schwarz) und Leervektor-transfizierten (grau) Zellen, $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die Berechnung der EC_{50} -Werte erfolgte in SigmaPlot.

Unten gezeigt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen (—) und die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen (·····) bei der Applikation von $20 \mu\text{M}$ FL101237. Die Skala entspricht $y = 50$ relative Lichteinheiten und $x = 40$ Sekunden.

Mit einem EC_{50} -Wert von $8,1 \mu\text{M}$ für TAS2R1 und $5,3 \mu\text{M}$ für TAS2R46 zeigte die Testsubstanz FL101237 eine etwas höhere Potenz für TAS2R1. Auch das Maximalsignal von FL101237 und somit die Effektivität war für TAS2R1 höher als für TAS2R46. Bei simultaner Applikation von $300 \mu\text{M}$ Picrotoxinin und $30 \mu\text{M}$ FL101237 auf TAS2R46-exprimierende Zellen konnte im Vergleich zur alleinigen Applikation von $300 \mu\text{M}$ Picrotoxinin eine Reduktion des Rezeptorsignals auf 53 Prozent beobachtet werden (Abbildung 30). Somit stellte sich FL101237 als partieller Agonist von TAS2R46 dar.

4. Diskussion

Gegenstand dieser Arbeit war es die Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung zu untersuchen und neue Antagonisten humaner Bittergeschmacksstoffrezeptoren zu finden. Das Untersuchen von Bitterstoffen auf deren antagonistisches Potential hat in diesem Umfang noch nicht stattgefunden. Aus einer chemisch hoch diversen Substanzbibliothek von 52 Testsubstanzen konnten 20 bisher unbekannte Antagonisten für die acht Testrezeptoren (TAS2R9, -R10, -R14, -R16, -R38, -R43, -R46, -R50) identifiziert werden. Das Maß der Inhibition variierte dabei sehr stark für die einzelnen Antagonisten-TAS2R-Kombinationen. Interessanterweise agierten drei der Testsubstanzen als breitbandige Antagonisten, welche sechs und mehr TAS2Rs inhibierten. Diese wurden näher untersucht und die bestimmten IC_{50} -Werte zeigten, dass die Inhibitoren mit unterschiedlicher Potenz auf die Bittergeschmacksrezeptoren wirkten.

Eine Testsubstanz wurde auf alle bis dato 21 deorphanisierten Bittergeschmacksrezeptoren als Antagonist getestet. Erstaunlicherweise konnte diese als Inhibitor von 18 und als Agonist von zwei TAS2Rs identifiziert werden. Das Prinzip des gleichzeitigen Wirkens von Bitterstoffen als Agonist und Antagonist verschiedener Teilmengen von Bittergeschmacksrezeptoren, welches in vorangegangenen Studien entdeckt wurde (Behrens et al., 2017a; Brockhoff et al., 2011; Slack et al., 2010), konnte in der vorliegenden Arbeit in großem Ausmaß belegt werden.

4.1 Die Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung

Bei der Suche nach Antagonisten für Bittergeschmacksrezeptoren wurde die Substanz GIV3727 (4-(2,2,3-trimethylcyclopentyl)-Buttersäure) entdeckt. Interessanterweise stellte sich GIV3727 als Antagonist von mehreren TAS2Rs heraus. Des Weiteren konnte die inhibierende Wirkung in sensorischen Tests bestätigt werden, wobei die Substanz selbst keinen Eigenschmack besaß (Slack et al., 2010). Nach dieser Entdeckung folgten weitere Studien zu Bittergeschmacksstoffantagonisten. So fanden Brockhoff und Kollegen (2011) Bitterstoffe, welche als Liganden von mehreren Bittergeschmacksrezeptoren fungierten und diese sowohl aktivierten als auch inhibierten. Bei der Suche nach Agonisten für TAS2R46 wurden zwei Sesquiterpenlactone gefunden, welche eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zum Agonisten Costunolid aufwiesen, selbst den Rezeptor aber nicht aktivierten (Brockhoff et al., 2007). Folgende Experimente zeigten, dass beide Bitterstoffe, 3 β -Hydroxydihydrocostunolid (3HDC) und 3 β -Hydroxy-pelenoid (3HP), nicht nur auf TAS2R46, sondern auch auf TAS2R30 als Antagonisten wirkten. Des Weiteren reduzierte 3HDC auch das Calciumsignal von TAS2R40

und 3HP das des TAS2R31. Gleichzeitig konnten die Sesquiterpenlactone als Agonisten von TAS2R10 und -R14, 3HDC sogar von vier weiteren Bittergeschmacksrezeptoren identifiziert werden (Brockhoff et al., 2011).

Um die Frage zu beantworten, ob noch andere Bitterstoffe sowohl Agonisten als auch Antagonisten verschiedener Teilmengen von Bittergeschmacksrezeptoren sind, wurde eine Substanzbibliothek zusammengestellt (Alessandro Marchiori, DIfE, Abteilung Molekulare Genetik). In Anlehnung an die Deorphanisierungsstudie von Meyerhof und Kollegen (2010a) wurden 52 Bitterstoffe ausgewählt, welche ein breites Spektrum an Substanzklassen und chemischen Strukturen abdeckten (Tabelle 6). Um die unterschiedlichen Charakteristika der Bittergeschmacksrezeptoren zu berücksichtigen, wurden zunächst sieben als Testrezeptoren ausgewählt, die sich hinsichtlich ihrer Anzahl bekannter Agonisten deutlich unterschieden. Zum Beispiel sind TAS2R10, -R14 und -R46 für ihr breites Agonistenspektrum bekannt (Meyerhof et al., 2010a; Behrens und Meyerhof, 2017c) während für den TAS2R50 bislang nur zwei aktivierende Substanzen gefunden werden konnten (Behrens et al., 2009; Behrens et al., 2018a). Nachdem sich herausstellte, dass mit 14 Inhibitoren TAS2R50 im Vergleich zu den anderen Testrezeptoren die mit Abstand größte Zahl von Antagonisten besitzt, wurde mit dem TAS2R9 ein weiterer Bittergeschmacksrezeptor mit nur wenigen publizierten Agonisten untersucht. Allerdings konnten für diesen nur fünf Bitterstoffe identifiziert werden, welche das Agonisten-induzierte Calciumsignal statistisch signifikant herabsetzten. In diesem Zusammenhang sollte jedoch erwähnt werden, dass der TAS2R9 bei den Calciummessungen vor der Normierung auf die Kontrollzellen oft ein recht geringes Signal zeigte, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass schwache Antagonisten, die nur zu einem geringfügig kleineren Fluoreszenzsignal führten, als solche nicht erkannt werden konnten. Von den 14 Inhibitoren des TAS2R50 reduzierten fünf Substanzen den Rezeptor nur um 30 Prozent und weniger. Interessant ist, dass Denatoniumbenzoat, die bitterste bekannte Substanz (Saroli, 1984), sich mit einer Signalreduktion um mehr als die Hälfte als der effektivste TAS2R50-Antagonist darstellte. Denatoniumbenzoat zeigte erst eine signifikante Inhibition ab der höchsten eingesetzten Konzentration (3 mM). Wohingegen Naphazolin bereits im nanomolaren Bereich (30 nM) zu einer Hemmung von 37 Prozent führte. Für acht der Antagonisten konnte kein modulatorisches Potential auf die anderen sieben Testrezeptoren festgestellt werden, sie wirkten spezifisch auf TAS2R50. Die Zahl der synthetischen bzw. in der Natur vorkommenden TAS2R50-Inhibitoren halten sich die Waage, jeweils sieben gehören in eine der beiden Gruppen. Dies gilt auch für die sechs Hemmstoffe von TAS2R14. Chloroquin und Phenanthrolin, die einzigen gefundenen Antagonisten für den TAS2R38 sind beide synthetischen Ursprungs. Wobei Phenanthrolin ein bei weitem höheres antagonistisches Potential aufweist als Chloroquin, da dieser Bitterstoff das TAS2R38-Signal auf Phenylthiocarbamid, eingesetzt in der EC₉₀-Konzentration, vollständig hemmte. Chloroquin

reduzierte jedoch in 20fach höherer Konzentration nur zu rund 50 Prozent das relative Fluoreszenzsignal. Auch der TAS2R46 zeigte eine Tendenz zu synthetischen Stoffen als Antagonisten. Nur einer der fünf Inhibitoren (AITC) ist natürlichen Ursprungs und gleichzeitig der am potentesten auf TAS2R46 wirkende. Im Allgemeinen ist aber festzustellen, dass von insgesamt 20 der gefunden Bittergeschmacksrezeptorantagonisten genau zehn natürlichen und zehn synthetischen Ursprungs sind. Hier lässt sich kein allgemeines Prinzip für die Bittergeschmacksstoffmodulation feststellen. Auch in der breit angelegten Studie von Meyerhof und Kollegen (2010a), in der 104 natürliche und synthetische Bitterstoffe als Agonisten der Bittergeschmacksrezeptoren getestet wurden, zeigten zwar einige TAS2Rs eine Verschiebung zu Gunsten einer Gruppe, in der Gesamtheit der Agonisten ließ sich aber kein signifikanter Unterschied feststellen. Allerdings zeigte der TAS2R46 eine Vorliebe für natürliche Agonisten (Meyerhof et al., 2010a).

In der Substanzbibliothek befanden sich keine Stoffe, welche das Agonisten-induzierte Rezeptorsignal erhöhten. Bis dato sind keine Bitterstoffe die als positive Modulatoren von Bittergeschmacksstoffen fungieren publiziert. Allerdings ist das wirtschaftliche Interesse für den Bittergeschmack verstärkende Substanzen eher gering, da nur wenige Einsatzgebiete vorstellbar sind. Zum Beispiel werden bitter schmeckende Substanzen als Schutz vor dem Verschlucken von gesundheitsschädlichen Produkten verwendet. Mit Denatoniumbenzoat und Denatoniumsaccharin, um nur zwei zu nennen, stehen Substanzen zur Verfügung, die aufgrund des starken Bittergeschmacks verlässlich vor dem versehentlichen Verschlucken schützen.

4.1.1 Das Ligandenspektrum der Bittergeschmacksrezeptoren

Anzumerken ist, dass die hier verwendeten Testsubstanzen zum Teil bekannte Agonisten der untersuchten Rezeptoren sind und sich so die Gesamtzahl der getesteten Substanzen für die Rezeptoren unterscheidet. So befanden sich 13 Agonisten von TAS2R10 und -R38 in der 52 Stoffe umfassenden Substanzbibliothek, womit 39 auf einen inhibitorischen Effekt getestet wurden. Obwohl keiner der 52 Bitterstoffe ein Agonist von TAS2R9 ist, wurden für diesen Rezeptor nur 5 Antagonisten gefunden. Ähnlich stellt es sich für TAS2R14 dar, mit 6 Antagonisten aus einem Pool von 50 Substanzen. Wie bereits beschrieben wurden für TAS2R50 14 Antagonisten gefunden, wobei hier eine ähnlich hohe Anzahl an Testsubstanzen vorlag wie für TAS2R9 und -R14 (51).

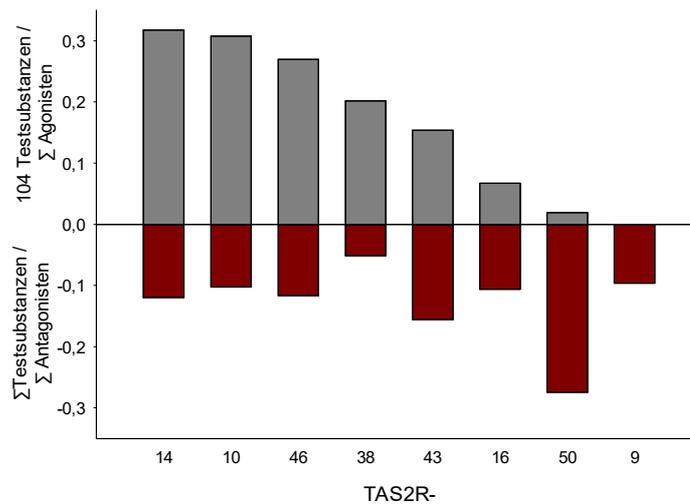


Abbildung 32: Das Ligandenspektrum der TAS2Rs.

Dargestellt sind für die acht Testrezeptoren die Quotienten der gefundenen Agonisten in Bezug auf 104 Testsubstanzen (grau, Meyerhof et al., 2010a) und die Quotienten gebildet aus der Anzahl der identifizierten Antagonisten in Bezug auf die Gesamtzahl der Testsubstanzen (rot) aus der vorliegenden Arbeit.

In Abbildung 32 ist das Verhältnis der Liganden (Agonisten und Antagonisten) abgebildet für die acht Testrezeptoren. Um das Agonisten- und Antagonisten-Spektrum zu vergleichen wurden nur die Agonisten aus der Studie von Meyerhof und Kollegen (2010a) verwendet, da diese auf alle acht TAS2Rs als Agonisten untersucht wurden. Nicht alle bis dato identifizierten Agonisten sind in der Graphik enthalten, um kein verzerrtes Bild der Bitterstoff-Sensitivität der Bittergeschmacksrezeptoren abzubilden. In der Studie von Meyerhof und Kollegen (2010a) wurden über hundert Substanzen auf alle 25 TAS2Rs appliziert, wobei jeder der Rezeptoren ein individuelles Agonistenspektrum zeigte. Mit insgesamt vier (TAS2R10), sechs (TAS2R14) und fünf (TAS2R46) gefundenen Antagonisten in dieser Studie, lässt sich die Vielzahl der Agonisten, die für diese Rezeptoren bekannt sind, nicht ohne weiteres auf die Anzahl der Antagonisten übertragen. Entgegen den Erwartungen wurde für TAS2R50, einem Rezeptor mit sehr wenigen Agonisten, die mit Abstand größte Zahl an Inhibitoren gefunden. Anscheinend ist das Ligandenspektrum, bestehend aus der Summe von aktivierenden und hemmenden Substanzen weitaus größer als bisher angenommen.

Bislang deuten viele Forschungsergebnisse darauf hin, dass Bittergeschmacksrezeptoren mit einer orthosterischen Bindungstasche ausgestattet sind (Born et al., 2013; Brockhoff et al., 2010; Sakurai et al., 2010). Hier befinden sich individuelle Kontaktpunkte, an denen die Agonisten binden und den Rezeptor aktivieren (Brockhoff et al., 2010). Nach den Autoren einer Studie besitzt TAS2R10 ein weit gefächertes Spektrum strukturell sehr unterschiedlicher Agonisten allerdings geht diese Eigenschaft zu Ungunsten der Affinität (Born et al., 2013). Die Eigenschaften der Bindungstasche, welche zur Aktivierung führen, sind von Rezeptoren mit nur wenigen bekannten Agonisten wie dem TAS2R50 und -R9 noch nicht bekannt (Behrens

et al., 2018b). So könnte es durchaus sein, dass mehr Bitterstoffe als bislang angenommen in die Bindungstasche gelangen und den Rezeptor zwar nicht aktivieren aber die Bindung des Agonisten verhindern. Es gibt auch Hinweise auf allosterische Bindungsstellen (Greene et al., 2011; Sandal et al., 2015), die in Abschnitt 4.4 noch näher betrachtet werden.

Umgehen werden könnte das Ungleichgewicht, welches durch die unterschiedliche Anzahl an Testsubstanzen der einzelnen Rezeptoren entsteht, durch die ausschließliche Verwendung von Substanzen, die keinen der Testrezeptoren aktivieren. Allerdings wurden einige der Stoffe aufgrund interessanter Eigenschaften ausgewählt. Zum Beispiel ist Diphenidol ein bekannter Agonist von 15 Bittergeschmacksrezeptoren (Meyerhof et al., 2010a). Somit wurde angenommen das Diphenidol, ähnlich wie beim oben beschriebenen Fall der TAS2R46-Antagonisten 3HP und 3HDC, in die Bindungstasche der Testrezeptoren passen würde, diese zwar nicht aktiviert aber mit den Agonisten konkurriert und so zu einer Hemmung der Rezeptorantwort führt. Jedoch konnte keine Inhibition bei einem der acht Rezeptoren festgestellt werden. Cucurbitacin E wurde aufgrund der strukturellen Übereinstimmung mit Cucurbitacin B getestet, da letzterer Bitterstoff ein Agonist von TAS2R14 ist (Behrens und Meyerhof, 2017c). Auch hier stellte sich die Annahme, dass chemisch konvergente Bitterstoffe um die Bindungstasche konkurrieren und so zu einer verminderten Rezeptorantwort führen, als falsch heraus. An diesem Beispiel zeigt sich, dass einzelne Bittergeschmacksrezeptoren zum einen von vielen Substanzen, welche den unterschiedlichsten Stoffklassen angehören, aktiviert werden können; zum anderen aber hoch selektiv selbst auf geringste Unterschiede in der Ligandenkonformation reagieren. Bestätigt wurde dies auch in anderen Studien zum Agonistenspektrum der Bittergeschmacksrezeptoren (Behrens et al., 2004; Brockhoff et al., 2007).

4.1.2 Die individuelle Wirkung der Antagonisten

Ein weiteres Zeichen für die Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung zeigt sich an den überwiegend spezifischen Signalreduktionen der einzelnen Antagonisten-Rezeptor-Paare. So wurde das relative Fluoreszenzsignal von TAS2R9 mit dem Agonisten Pirenzepin von den fünf Antagonisten auf 77 Prozent (AITC), 70 Prozent (Colchicin), 54 Prozent (Chloroquin), 49 Prozent (Phenanthrolin) und 23 Prozent (Famotidin) des Ausgangswertes gesenkt. Wobei der potenteste Inhibitor Famotidin nur auf TAS2R9 als Antagonist wirkte. Auch das Strychnin-induzierte Calciumsignal von TAS2R10 wurde von jedem der vier Inhibitoren unterschiedlich stark, mit einer Signalreduktion im Bereich von 81 (AITC) bis elf Prozent,

beeinflusst. Gleiches gilt für TAS2R14, -R38 und -R46 (Tabelle 8). Auch bei diesen Rezeptoren zeigte jeder Hemmstoff eine unterschiedlich ausgeprägte Rezeptor-Signal Inhibition.

Die Antagonisten von TAS2R16, -R43 und -R50 lassen sich abhängig von der Stärke der Rezeptorhemmung jeweils in drei Gruppen einteilen. So führte die simultane Applikation des Agonisten Salicin und Phenanthrolin auf TAS2R16 nur zu einer geringen Reduzierung des relativen Fluoreszenzsignals auf 85 Prozent. Hydrocortison und Yohimbin zeigten sich als potentere Inhibitoren mit einer Signalreduktion auf 69 bzw. 66 Prozent. AITC und Chloroquin hemmten TAS2R16 um rund 50 Prozent. Für TAS2R43 bilden, mit einer Signalreduktion auf 71 und 79 Prozent, AITC und Phenanthrolin eine Gruppe. Caprolactam, Chloroquin, Colchicin und Cycloheximid reduzierten die TAS2R43-Calciumspur um ca. die Hälfte. Yohimbin hingegen stellte sich mit der vollständigen Hemmung des Agonisten-induzierten Signals als Inhibitor mit weitaus höherer Potenz dar. Wie bereits erwähnt erzielte die Applikation von fünf TAS2R50-Antagonisten eine Inhibition um rund 30 Prozent. In die zweite Gruppe für TAS2R50 mit einer Inhibitionsstärke von 34 bis 45 Prozent können sieben der insgesamt 14 Antagonisten eingeordnet werden. Denatoniumbenzoat und Yohimbin zeigten die stärkste Wirkung mit einer Signalreduktion um 59 bzw. 53 Prozent. Auffällig dabei ist, dass für den TAS2R50 zwar mit Abstand die größte Anzahl an Antagonisten gefunden wurde, aber keiner das Agonisten-Signal vollständig zu hemmen vermochte.

Mit einem durchschnittlichen relativen Fluoreszenzsignal von $1,15 \Delta F/F$ hervorgerufen durch die alleinige Applikation von Salicin auf TAS2R16, besaß dieser das höchste maximale Calciumsignal aller acht Testrezeptoren. Salicin scheint als aktivierende Substanz vom TAS2R16 so potent zu sein, dass keiner der Inhibitoren das Signal vollständig zu hemmen vermochte. Dies deckt sich auch mit einer Studie von Kim und Kollegen (2015). Die Autoren entdeckten fünf Peptide, welche alle Umamigeschmacksstoffe sind und das Salicin-induzierte TAS2R16-Signal hemmten. Aber auch hier wurde das Calciumsignal nie vollständig gehemmt (Kim et al., 2015).

Von den insgesamt 20 Antagonisten wirkten zwölf auf nur einen der acht Testrezeptoren. TAS2R10, -R38 und -R46 besitzen nur Hemmstoffe, welche auch auf weitere Rezeptoren wirkten. Cycloheximid, ein vom Bakterium *Streptomyces griseus* produziertes Antibiotikum (Kominek, 1975), konnte als Antagonist von TAS2R14 und -R43 identifiziert werden. Wobei Cycloheximid auf TAS2R43, mit einer Signalreduktion um mehr als die Hälfte, eine stärkere Wirkung entfaltete als auf TAS2R14. Hier wurde das Agonisten-induzierte Signal um 34 Prozent verringert. Yohimbin, ein pflanzliches Alkaloid mit aphrodisierender Wirkung (Fabricant und Farnsworth, 2001), stellte sich als Hemmstoff von drei Bittergeschmacksrezeptoren heraus. Während das Calciumsignal von TAS2R16 und -R50 nur auf 66 bzw. 47 Prozent durch Yohimbin vermindert wurde, konnte eine vollständige Inhibition von TAS2R43, aktiviert durch Aristolochiasäure, beobachtet werden. Interessant dabei ist, dass auch in

anderen Studien untersuchte Hemmstoffe von Bittergeschmacksrezeptoren auf TAS2R43 mit einer höheren Potenz als auf andere Rezeptoren wirkten. Allerdings wurde TAS2R43 mit anderen Agonisten aktiviert. So stellten Suess und Kollegen (2016) fest, dass der Geruchsstoff (R)-Citronellal das Koffein-induzierte Calciumsignal von TAS2R43 vollständig unterdrückte, wohingegen bei TAS2R46 nur eine Reduktion im höchsten Konzentrationsbereich stattfand. Des Weiteren zeigten zwei Substanzen, GIV3727 und Natriumcyclamat, ein höheres antagonistisches Potential auf TAS2R43 als auf TAS2R31, beide aktiviert mit dem Agonisten Saccharin (Behrens et al., 2017a; Slack et al., 2010).

Saccharin ist, sowie Cyclamat, ein nicht-kariogener Zuckerersatzstoff und Bestandteil von vielen kalorienreduzierten Lebensmitteln (Bergamo et al., 2011; Schiffmann und Gatlin, 1993). Es ist bekannt, dass Saccharin und Cyclamat in hohen Konzentrationen einen bitteren Nachgeschmack aufweisen (Behrens et al., 2017a; Galindo et al., 2006). Nachdem Saccharin eine antagonistische Wirkung auf drei Testrezeptoren zeigte (Tabelle 8) und auch Cyclamat in Vorversuchen die Rezeptorsignale von TAS2R9, -R43 und -R50 reduzierte (Daten nicht gezeigt), wurde aufgrund ihrer breiten Anwendung als Süßstoffe und des daraus entstehenden Interesses, weitere Rezeptoren hinzugezogen. Es konnte gezeigt werden, dass TAS2R31 und -R43 auf Saccharin durch die Zugabe von Cyclamat gehemmt werden. Dadurch konnte das lang bekannte Phänomen, dass eine Mischung aus Saccharin und Cyclamat sich vorteilhaft auf die Süßkraft auswirkt und den ungewollten Bittergeschmack reduziert (Vincent et al., 1955) durch funktionelle Calciummessungen erklärt werden (Behrens et al., 2017a). Wie in Abbildung 33 dargestellt reduzierten beide Süßstoffe das Agonisten-induzierte Calciumsignal mehrerer TAS2Rs.

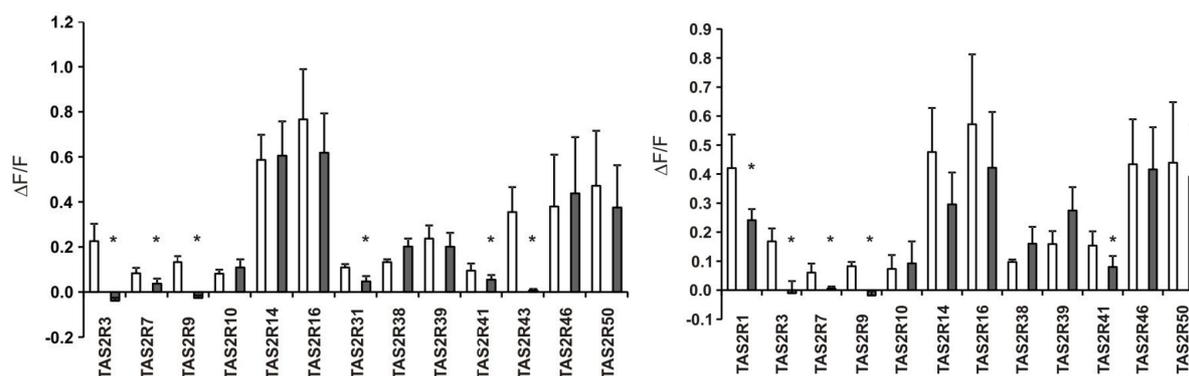


Abbildung 33: Cyclamat (links) und Saccharin (rechts) als Inhibitor humaner Bittergeschmacksrezeptoren (Behrens et al., 2017a).

Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzsignale hervorgerufen durch die alleinige Applikation des Agonisten (weiß) im Vergleich zur simultanen Zugabe des Agonisten und 33 mM Natriumcyclamat bzw. Natriumsaccharin (schwarz, * $p \leq 0,05$).

Es wurden stabile Zelllinien verwendet, bei denen die Expression der Bittergeschmacksrezeptoren durch Tetracyclin induziert wurde. Für Cyclamat decken sich die Ergebnisse meiner Vorstudien mit denen der Publikation, obwohl die Signalreduktion von TAS2R50 statistisch nicht signifikant war, lässt sich im Graphen durchaus eine Abnahme der relativen Fluoreszenzwerte ablesen. Saccharin zeigte bei den stabil-transfizierten TAS2R10-Zellen keinen antagonistischen Effekt, allerdings lag hier das maximale Rezeptorsignal unter $\Delta F/F$ 0,1 im Gegensatz zu $\Delta F/F$ 0,36 bei den transient-transfizierten TAS2R10-Zellen, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Und bereits hier zeigte Saccharin nur eine ausgesprochen geringe Inhibition. Für TAS2R46 wurden zwei verschiedene Agonisten (Strychnin bei Behrens et al., 2017a; Picrotoxinin in dieser Arbeit) verwendet. Obgleich auch hier und bei TAS2R50 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der alleinigen Applikation des Agonisten und der gleichzeitigen Zugabe von Agonist und Saccharin vorlagen, ist in Abbildung 33 eine geringe Abnahme der Calciumsignale zu erkennen.

4.1.3 Die Dosis-Wirkungsbeziehungen ausgewählter Antagonisten

Drei Testsubstanzen hoben sich aufgrund ihrer hohen Anzahl an Rezeptoren auf welche die Stoffe als Antagonisten wirkten, hervor. Um die Antagonist-Agonist-Beziehung weiter zu untersuchen wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden die Agonisten in der EC_{50} -Konzentration simultan mit steigenden Konzentrationen der Antagonisten auf die TAS2R-exprimierenden Zellen appliziert und die IC_{50} -Werte bestimmt. Diese Kenngröße gibt Aufschluss über die Potenz eines Inhibitors und bezeichnet die Konzentration, bei der das maximale Rezeptorsignal um die Hälfte gehemmt wird. Chloroquin, welches als Medikament gegen Malaria eingesetzt werden kann (Djimé et al., 2001), blockierte die Rezeptorantwort von TAS2R9, -R14 und -R38 vollständig. Die höchste Potenz mit einem IC_{50} -Wert von 25,3 μM zeigte Chloroquin auf TAS2R9, gefolgt von TAS2R46 (IC_{50} 50,6 μM). TAS2R14 und -R46 wurden beide mit Picrotoxinin aktiviert, allerdings war die Stärke der Inhibition und die Potenz individuell. Zwar waren die relativen Fluoreszenzwerte ausgelöst durch Picrotoxinin und der geringsten Konzentration von Chloroquin für beide Rezeptoren ähnlich hoch (ca. 0,2 $\Delta F/F$), jedoch erfolgte bei TAS2R14 mit einem IC_{50} -Wert von nahezu 300 μM eine vollständige Unterdrückung des Picrotoxinin-Signals, wohingegen TAS2R46 nur zu 43 Prozent aber dafür mit einem IC_{50} -Wert von 50,6 μM gehemmt wurde. Für TAS2R46, welcher für sein ausgesprochen weites Agonistenspektrum bekannt ist, konnte Chloroquin als partieller Agonist identifiziert werden.

Phenanthrolin inhibierte die Agonisten-induzierten Calciumsignale von TAS2R16 und -R50 nur um 17 Prozent, allerdings lag die halbmaximale inhibitorische Wirkung für TAS2R16 in einem

fast 10fach höheren Konzentrationsbereich (IC_{50} 53 μ M) als bei TAS2R50 (IC_{50} 4,3 μ M). Im ähnlichen mikromolaren Bereich wie bei TAS2R50 lag die inhibitorische Potenz von Phenanthrolin auch bei TAS2R10, -R14, -R38 und -R46, wobei letztere Rezeptoren durch die Zugabe des Antagonisten vollständig gehemmt wurden. Obwohl für TAS2R10 und -R50 das maximale Rezeptorsignal mit 0,31 bzw. 0,27 $\Delta F/F$ ähnlich hoch war. Hier zeigte sich, dass die Effizienz, mit welcher der Antagonist die Rezeptorantwort zu reduzieren vermochte, nicht zwingend abhängig ist von der initialen Höhe der relativen Fluoreszenzsignale.

Als weiterer breitbandiger Inhibitor konnte AITC identifiziert werden. AITC ist ein bekannter Agonist von TAS2R38 und somit wurde die antagonistische Wirkung auf die anderen sieben Testrezeptoren untersucht. Dabei zeigte sich AITC für alle TAS2Rs als Inhibitor, wobei zur weiteren Charakterisierung des inhibitorischen Effekts TAS2R14 sowohl mit Picrotoxinin als auch mit Aristolochiasäure aktiviert wurde. Interessanterweise zeigte AITC auch auf das Aristolochiasäure-TAS2R14-Signal eine inhibitorische Wirkung. Folglich ist die TAS2R14-Inhibition durch AITC nicht spezifisch für den Agonisten Picrotoxinin. Allerdings erwies sich AITC auf das Picrotoxinin-TAS2R14-Signal sowohl als weitaus potenterer als auch effizienterer Antagonist mit einem mehr als halb so niedrigen IC_{50} -Wert im Vergleich zu TAS2R14 auf Aristolochiasäure und der vollständigen Signalhemmung. AITC trägt zum scharfen Geschmack von Senf bei und besitzt antiinflammatorische, antioxidative und antikanzerogene Eigenschaften (Ernst et al., 2011; Wagner et al., 2012; Zhang et al., 2010). Oka und Kollegen konnten bei Mäusen durch Nervenableitungen der *Chorda tympani* nachweisen, dass AITC als Hemmstoff sowohl für hohe Natrium- und Kaliumchlorid Konzentrationen, als auch für drei Bitterstoffe (Chinin, Cycloheximid, Denatonium) fungiert (Oka et al., 2013). Dabei ist bekannt, dass hohe Mengen an Natrium- und Kaliumchlorid zu aversiven Verhalten führen (Chandrashekar et al., 2010; Oka et al., 2013). Alle drei Bitterstoffe sind Agonisten des Mausbitterrezeptors 105, welcher phylogenetisch einen gemeinsamen Vorfahren mit dem humanen TAS2R10 hat (Lossow et al., 2016). Denkbar wäre, dass unter anderem der TAS2R10 an der Vermittlung des aversiven Hochsalzgeschmacks beteiligt ist. Die wenig ausgeprägte Konservierung der Agonistenspektren orthologer Bitterrezeptoren von Maus und Mensch (Lossow et al., 2016) könnte jedoch auch andere Konstellationen möglich erscheinen lassen.

Für vier der insgesamt sieben entdeckten Antagonisten von TAS2R43 wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Hier stellte sich in Bezug auf die Potenz und Effizienz der Inhibition eine klare Rangordnung dar. Bereits ab einer Konzentration von 20,4 μ M hemmte Phenanthrolin das Aristolochiasäure-Signal um die Hälfte, in absteigender Reihenfolge gefolgt von Chloroquin (IC_{50} 86,2 μ M), Yohimbin (IC_{50} 126,9 μ M) und AITC (IC_{50} 340 μ M), als am wenigsten potenter Antagonist. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Stärke der Inhibition des

maximalen Rezeptorsignals in absteigender Effizienz wie folgt: Yohimbin (vollständige Hemmung, um 100 Prozent), Chloroquin (um 63 Prozent), AITC (um 46 Prozent), Phenanthrolin (um 30 Prozent).

Da bei einigen Dosis-Wirkungs-Experimenten kein Plateau des Rezeptorsignals erlangt wurde, wie zum Beispiel bei TAS2R16 auf AITC und Phenanthrolin, kann nicht ausgeschlossen werden, dass höhere Konzentrationen der Antagonisten zu einer weiteren Absenkung der residualen Fluoreszenzsignale führen würden. Jedoch war dies aufgrund der Löslichkeit oder dem Auslösen von unspezifischen Fluoreszenzsignalen in diesem experimentellen Aufbau nicht möglich.

Auffallend sind die Parallelen zwischen aktivierenden und hemmenden Substanzen der Bittergeschmacksrezeptoren. So zeigten die auf mehrere TAS2Rs wirkende Antagonisten nahezu immer eine unterschiedliche Potenz und Effizienz der Inhibition auf die einzelnen Bittergeschmacksrezeptoren. Ähnlich verhalten sich die Agonisten der TAS2Rs. Zum Beispiel aktiviert Picrotoxinin TAS2R14 und TAS2R46, wobei der EC_{90} -Wert von TAS2R14 auf Picrotoxinin (70 μ M, Behrens et al., 2004) ca. viermal geringer ist als von TAS2R46 (300 μ M, Brockhoff et al., 2011). Die maximalen Rezeptorsignale (Abbildung 15) hervorgerufen durch Picrotoxinin lagen bei 0,41 $\Delta F/F$ (TAS2R14) und 0,32 $\Delta F/F$ (TAS2R46). Inhibiert werden die Bittergeschmacksrezeptoren vom nanomolarem (30 nM Naphazolin auf TAS2R50) bis zum millimolaren Konzentrationsbereich (30 mM Arbutin auf TAS2R14). Gleiches gilt für die Potenz der Agonisten der TAS2Rs (Behrens und Meyerhof, 2018b). Es gibt Agonisten und Antagonisten, welche nur auf einen Rezeptor einen modulatorischen Effekt zeigten, aber auch Substanzen, welche eine Wirkung auf mehrere TAS2Rs entfalten. Des Weiteren können sich die Antagonisten und auch die Agonisten-Spektren der Bittergeschmacksrezeptoren teilweise überlappen (Behrens et al., 2017c; Brockhoff et al., 2011; Meyerhof et al., 2010a).

4.1.4 Eine natürliche Substanz als breitbandiger Antagonist

Nachdem die Substanz FL101237 (Hardwickische Säure) bei Experimenten vom Kooperationspartner Givaudan eine hemmende Wirkung auf mehrere Bittergeschmacksrezeptoren zeigte, wurde FL101237 in der vorliegenden Arbeit auf alle 21 deorphanisierten TAS2Rs als Antagonist getestet werden. Erstaunlicherweise inhibierte die Testsubstanz die Agonisten-induzierten Calciumsignale von 19 TAS2Rs, wobei für elf Rezeptoren die relativen Fluoreszenzsignale vollständig unterdrückt wurden. Aber auch dieser breitbandige Inhibitor konnte als Agonist von TAS2R1 und als partieller Agonist von TAS2R46

identifiziert werden. Dies deckt sich mit sensorischen Tests (Givaudan) indem die Substanz als leicht bitter schmeckend beschrieben wurde.

4.2 Die TAS2R-Spezifität der Inhibition

Mittels funktionellen Calcium-Messungen von TAS2R-exprimierenden Zellen wurden die Aktivierungsmuster der Bittergeschmacksrezeptoren analysiert. Um neue Antagonisten für Bittergeschmacksrezeptoren zu finden wurde die Höhe der relativen Fluoreszenzwerte zwischen der alleinigen Applikation des TAS2R-Agonisten und der simultanen Zugabe von Agonist und Testsubstanz verglichen. Dabei war es wichtig auszuschließen, dass die Inhibition nicht aufgrund unspezifischer endogener Faktoren verursacht wurde, sondern die Reduktion des Fluoreszenzsignals auf den exprimierten Bittergeschmacksrezeptor zurück zu führen war.

4.2.1 Bitterrezeptorunabhängige Einflüsse auf zelluläre Calciumfluktuationen

Als Antagonisten wurden die Testsubstanzen definiert, welche nach der Normierung auf die Fluoreszenzsignale der Leervektor-transfizierten Zellen, eine Reduktion des Rezeptorsignals zeigten. Bei den Messungen konnte beobachtet werden, dass einige der Substanzen bei der Applikation auf die Kontrollzellen zu unspezifischen Artefakten führten. Die genauen Ursachen für den Anstieg oder Abfall der Calciumionenkonzentration im Cytosol der Zelle sind ungeklärt. Möglicherweise werden durch die Stoffe endogene Rezeptoren oder zelluläre Signalwege aktiviert durch die Ionen ein- oder ausströmen.

Besonderes Augenmerk muss auf die breitbandigen Antagonisten gelegt werden, welche zu negativen Artefakten führen, da hier die Möglichkeit einer unspezifischen Signalmodulation nahe liegt. So konnte Phenanthrolin als Inhibitor aller acht Testrezeptoren identifiziert werden, wobei die Applikation im Messsystem in negativen Calciumspuren resultierte (Anhang S.123-125, Abb. 18). Allerdings ist die Höhe der Artefakte zumeist ähnlich, die Stärke der Inhibition des Rezeptorsignals variiert jedoch. So wird TAS2R38 bei der simultanen Zugabe des Agonisten PTC und 0,1 mM Phenanthrolin vollständig inhibiert, bei TAS2R46 bzw. -R50 wird das Signal auf 46 bzw. nur 84 Prozent reduziert (Abb. 18, Anhang S.124-125). Hier zeigt sich, dass die Höhe der Inhibition nicht alleine auf unspezifischen Effekten beruhen kann.

Auch bei der Zugabe von Chloroquin konnte ein Abfall der Calciumspuren in den Messungen beobachtet werden. Sowohl bei den Leervektor-, als auch bei den Rezeptor-transfizierten Zellen führten 2 mM Chloroquin zu negativen Fluoreszenzwerten. Der Bitterstoff inhibierte das Calciumsignal von fünf Rezeptoren um circa 50 % (Tabelle 8). In Abbildung 30 ist die Wirkung

von Chloroquin auf die Rezeptoren TAS2R14, -R50 und -R46 dargestellt. Obwohl die Artefakte bei den Kontrollzellen ähnlich stark ausgeprägt waren, zeigten sich deutliche Unterschiede in der Höhe der Inhibition und der Wirkweise. So wird das TAS2R14-Signal hervorgerufen durch den Agonisten Picrotoxinin bei der simultanen Beigabe von 2 mM Chloroquin vollständig gehemmt. Die Calciumspur der TAS2R50-exprimierenden Zellen änderte zwar den Verlauf und fiel schneller ab, die maximale Höhe änderte sich hingegen nicht. Für TAS2R46 wurde Chloroquin als partieller Agonist identifiziert. Partielle Agonisten aktivieren den Rezeptor nicht vollständig, konkurrieren aber mit einem Vollagonisten um die Bindungstasche und führen so zu einer kompetitiven Hemmung (Rosenbaum et al., 2009). Wurden der Agonist Picrotoxinin und Chloroquin zusammen auf TAS2R46-exprimierenden Zellen vermessen resultierte dies in einer Rezeptorinhibition um 50 %. Während die alleinige Applikation der Testsubstanz TAS2R46 aktivierte (Tabelle 8, Abb. 34).

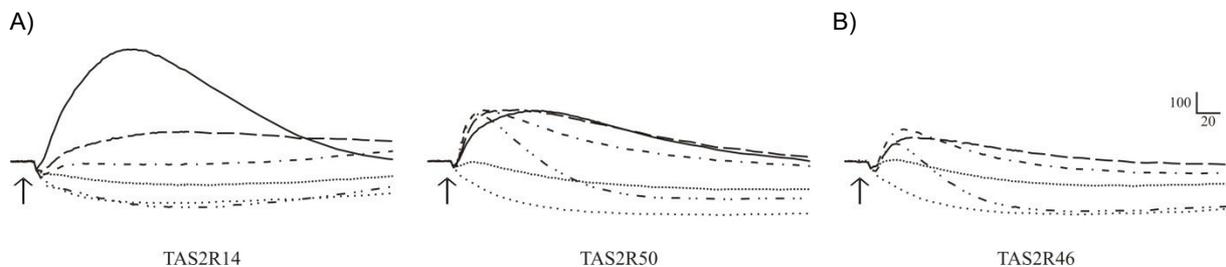


Abbildung 34: Chloroquin als Testsubstanz auf TAS2R14, -R50, -R46.

A) Dargestellt sind die Calciumsignale der Rezeptor-transfizierten Zellen aktiviert mit dem Agonisten (—) (TAS2R14 70 μ M Picrotoxinin, TAS2R50 100 μ M Andrographolid) und simultaner Applikation (Pfeil) des Agonisten und 0,2 mM Chloroquin (---); 0,6 mM Chloroquin (- - - -); 2 mM Chloroquin (- · · -). Als Negativkontrolle gezeigt sind die Calciumspuren der Leervektor-transfizierten Zellen mit gleichzeitiger Applikation des Agonisten und 0,6 mM Chloroquin (.....) bzw. 2 mM Chloroquin (. . . .).

B) Rechts gezeigt sind die Calciumspuren von TAS2R46-exprimierenden Zellen mit alleiniger Applikation von Chloroquin (0,2 mM Chloroquin — — —; 0,6 mM Chloroquin - - - -; 2 mM Chloroquin - · · -) und die Leervektor-transfizierten Zellen mit 0,6 mM Chloroquin und 2 mM Chloroquin. Die Skala entspricht y = 100 relative Lichteinheiten und x = 20 Sekunden.

Somit kann kein zwingender Zusammenhang zwischen dem Auslösen von negativen Artefakten bei der Applikation der Testsubstanzen im Messsystem und der Reduktion der relativen Fluoreszenzwerte der Agonisten-aktivierten Bittergeschmacksrezeptoren gezogen werden.

Die Möglichkeit, dass die Testsubstanzen, welche die relativen Fluoreszenzsignale der Bittergeschmacksrezeptoren hemmen, als inverse Agonisten der verwendeten Rezeptorvarianten fungieren, kann weitgehend ausgeschlossen werden. Inverse Agonisten setzen die Basalaktivität von Rezeptoren herab (Deupi und Kobilka, 2007). Allerdings erfolgte die Reduktion der Calciumsignale, ausgelöst durch die alleinige Zugabe der Teststoffe, bei

keiner der Substanzen nur auf den TAS2R-exprimierenden Zellen, sondern immer auch bei den Kontrollzellen (siehe Anhang). Somit wirkten die negativen Effekte nicht spezifisch auf die Bittergeschmacksrezeptoren.

4.2.2 Bitterrezeptorspezifität der Antagonisten

Nach der Applikation der Testsubstanzen wurde Somatostatin 14 (SST) auf die Zellen gegeben. Dieses aktiviert den endogenen Somatostatin-Rezeptor und diente bei den Calcium-Messungen als Vitalitätskontrolle der Zellen und um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Allerdings ließ sich bei mehreren Substanzen eine Auswirkung auf die Höhe der SST-Calciumspur beobachten. So wurde das Fluoreszenzsignal niedriger je höher die Konzentration der Testsubstanzen wurde. Anscheinend gibt es Bittersubstanzen, welche die Aktivierung des SST-Rezeptors oder dessen Signalweg beeinflussen. Um sicher zu stellen, dass die vorliegende Erniedrigung der Calciumsignale der TAS2R-exprimierenden Zellen auf einen direkten Effekt der Testsubstanz auf den Bittergeschmacksrezeptor zurückzuführen ist und nicht unspezifische Effekte der Inhibition zu Grunde lagen, wurden die SST-Signale ausgewertet. Im vollem Umfang sind die relativen Fluoreszenzwerte der Erstapplikation der Bitterstoffe und der Zweitapplikation von SST sowohl von den TAS2R-exprimierenden und den Leervektor-transfizierten Zellen im Anhang dargestellt.

Zu den Inhibitoren, welche die Höhe des SST-Signals beeinflussen gehört Allylisoithiocyanat. Der Bitterstoff reduzierte das TAS2R-Signal von sieben Rezeptoren in unterschiedlichem Maße (Tabelle 8), wobei durch die Zugabe von 1 mM AITC die relativen Fluoreszenzwerte der Somatostatinrezeptor-abhängigen Signale um 17 bis 57 Prozent im Vergleich zum SST-Signal nach der Applikation des Agonisten (Anhang S.113-115) abfielen.

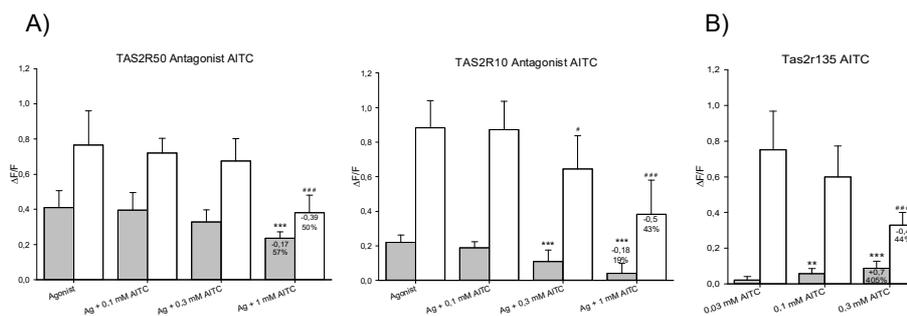


Abbildung 35: Vergleichende Darstellung der relativen Fluoreszenzwerte von Erst- und Zweitapplikation.

A) Dargestellt sind die relativen Fluoreszenzwerte der TAS2R-exprimierenden Zellen hervorgerufen durch die erste Applikation des Agonisten (TAS2R50 0,1 mM Andrographolid, TAS2R10 0,09 mM Strychnin) und der Kombination von Agonist (Ag) und AITC (Allylisothiocyanat) in steigender Konzentration (grau), und der nachfolgenden Zweitapplikation von SST (weiß), $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Im Graph angegeben ist die Abnahme der relativen Fluoreszenzwerte zwischen der alleinigen Applikation des Agonisten und der simultanen Zugabe des Agonisten und 1 mM AITC (oben die Reduktion um $x \Delta F/F$, unten die Reduktion auf $x \%$).

B) Zeigt die relativen Fluoreszenzwerte von Tas2r135 hervorgerufen durch die Aktivierung von AITC (grau) und die nachfolgende Zugabe von SST (weiß), $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Im Graph angegeben ist die Zu- bzw. Abnahme der relativen Calciumsignale (oben die Änderung um $x \Delta F/F$, unten die Reduktion auf $x \%$). Die experimentellen Daten wurden von Kristina Loßow erhoben.

Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt ($p \leq 0,05$ *; $p \leq 0,01$ **; $p \leq 0,001$ ***).

Beispielhaft lässt sich die Auswirkung von AITC auf die Höhe der Calciumsignale anhand der Abbildung 35 ablesen. So wurde das Calciumsignal von TAS2R50 aktiviert mit dem Agonisten Andrographolid durch die Zugabe von 1 mM AITC auf 57 % reduziert. Ähnlich stark (auf 50 %) nahm auch das anschließende SST-Signal ab. Auf das Agonisten-induzierte Signal von TAS2R10 entfaltete AITC eine stärkere Wirkung. Hier wurde das relative Fluoreszenzsignal im Schnitt auf 19 % minimiert, teilweise sogar vollständig inhibiert (Abb. 15). Wobei die Calciumspur der SST-Applikation nur auf 43 % herabgesenkt wurde. Des Weiteren ist ein Dosis-Wirkungs-Experiment mit AITC auf den Mausbittergeschmacksrezeptor 135 gezeigt (das Experiment wurde von Kristina Loßow durchgeführt und zur Verfügung gestellt). Hier zeigte sich die Aktivierung von Tas2r135 durch AITC, wobei das Rezeptorsignal bei der Zugabe von 0,3 mM AITC im Vergleich zur Applikation von 0,03 mM AITC um über 400 % ($0,07 \Delta F/F$) ansteigt, das SST-Signal aber auf 44% sinkt.

Ein weiterer Hinweis, dass das Absinken des SST-Signals nicht in direktem Bezug zum durch die Bitterstoffe ausgelösten Bittergeschmacksrezeptorsignal zu setzen ist, zeigen Testsubstanzen, welche nur einen oder wenige TAS2R inhibieren. Zum Beispiel führte Arbutin sowohl zu einem negativen Artefakt bei den Kontrollzellen, als auch zum Absinken der SST-Calciumspur bei alleiniger und simultaner Applikation mit dem Agonisten (Anhang S.115). Eine antagonistische Wirkung wurde aber nur auf den TAS2R14 beobachtet (Tabelle 8).

Auch bei dem breitbandigen Antagonisten FL101237 kam es bei der Applikation von 30 μM zu einem Absinken des SST-Signals. Dies zeigte sich allerdings sowohl bei TAS2R5, auf dem

FL10237 keine antagonistische Wirkung hatte, als auch bei TAS2R1 und -46, bei dem FL101237 als Agonist fungiert (Anhang S.135).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Calciummessungen im heterologen Expressionssystem mehrere Bitterstoffe zwar zu unspezifischen, nicht näher bekannten Effekten führten, im Allgemeinen aber ein direkter Zusammenhang zu den festgestellten Reduktionen der relativen Fluoreszenzsignale, hervorgerufen durch die spezifischen Agonisten und die simultane Zugabe des Antagonisten auf den TAS2R-exprimierenden Zellen, ausgeschlossen werden kann.

4.3 Die chemische Diversität der Antagonisten

Von allen Grundgeschmacksarten besitzen Bitterstoffe mit Abstand die größte Diversität (Meyerhof, 2005; Ley, 2008). Allgemeine Merkmale, die zur Aktivierung von TAS2Rs führen wurden noch nicht gefunden, wohl aber einzelne Aminosäurenreste oder chemische Eigenschaften, die für einen bestimmten Bitterstoff zur Aktivierung notwendig sind (Behrens und Meyerhof, 2013; Born et al., 2013; Brockhoff et al, 2007).

In Abbildung 36 sind exemplarisch die 14 Antagonisten von TAS2R50 und dessen Agonist Andrographolid abgebildet. Hier lassen sich zwar durchaus Gemeinsamkeiten finden wie zum Beispiel freie Elektronenpaare am Stickstoff oder Sauerstoff, endständige Methyl- und / oder Hydroxylgruppen, Benzolringe und andere. Aber keine dieser Eigenschaften ist exklusiv nur bei den Antagonisten zu finden, sondern auch bei anderen Stoffen aus der Substanzbibliothek (Tabelle 6), welche kein inhibitorisches Potential besitzen. Selbiges gilt für die anderen sieben Testrezeptoren und deren Antagonisten. Die breitbandigen Inhibitoren AITC, Chloroquin und Phenanthrolin zeichnen sich alle durch freie Elektronenpaare an Stickstoffatomen aus. Nur gilt dies auch für eine Vielzahl anderer Testsubstanzen wie Acetylpyrazin, Famotidin, Diphenidol und weitere. AITC kann sich bei der enzymatischen Umsetzung von Sinigrin bilden. Sinigrin wirkte allerdings nur auf TAS2R50 als Antagonist.

Das Fehlen übergeordneter gemeinsamer Strukturen, welche einen Rückschluss auf die Voraussetzungen für Antagonisten geben könnten, bestätigt die Resultate anderer Studien, bei denen für einzelne Gruppen die Agonisten chemische Merkmal gemeinsam haben, aber nie alle Agonisten (Meyerhof et al., 2010a). Zum Beispiel besitzen einige Agonisten des TAS2R16 eine β -Glucopyranosidgruppe. Allerdings wiesen diese funktionelle Gruppe auch drei Teststoffe aus der Substanzbibliothek (Aloin, Digitonin, Neohesperidin) auf, aktivierten oder hemmten TAS2R16 jedoch nicht. Auch Sulforaphan, dessen chemische Struktur das für TAS2R38-Agonisten gefundene NCS-Motiv enthält, zeigte kein modulatorischen Effekt auf den Rezeptor.

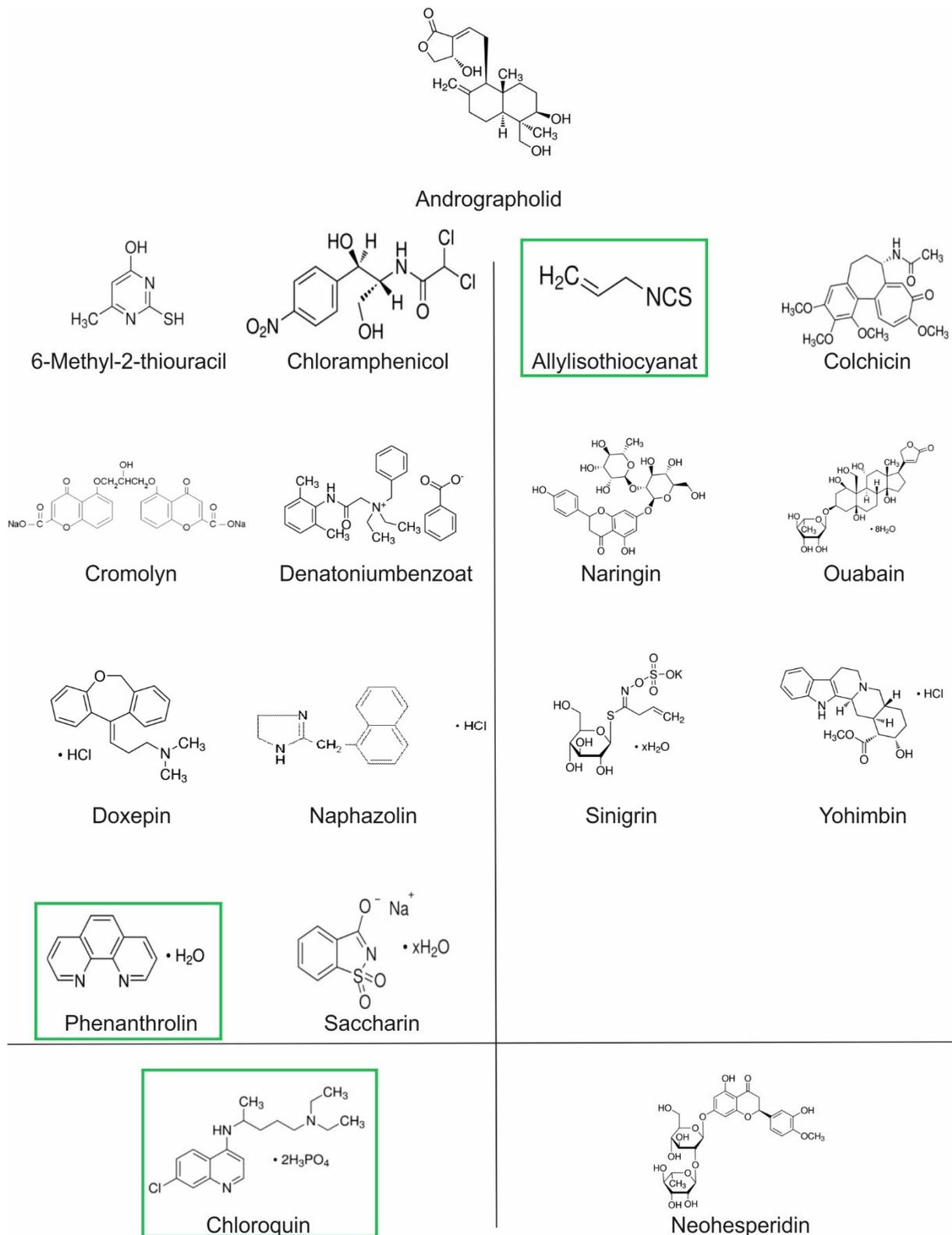


Abbildung 36: Die Antagonisten des TAS2R50 und weitere Bitterstoffe.

Dargestellt sind die 14 Antagonisten von TAS2R50 und Andrographolid, der verwendete Agonist für TAS2R50 (oben). Unten zu sehen sind Chloroquin als breitbandiger Antagonist und Neohesperidin als zu Naringin Struktur verwandter Stoff. Links sind die Substanzen synthetischen, rechts die Stoffe natürlichen Ursprungs. Grün umrandet sind die Strukturen der breitbandigen Inhibitoren. Die chemischen Strukturen wurden vom Hersteller Sigma-Aldrich bezogen.

Eine direkte Wechselwirkung zwischen dem jeweiligen Agonisten und den Antagonisten kann nicht ausgeschlossen werden. Zum Beispiel könnte der TAS2R14-Agonist Picrotoxinin mit dem TAS2R14-Antagonisten Arbutin über Wasserstoffbrückenbindungen wechselwirken. Andrographolid besitzt sechs Stereozentren und ist damit in der Lage seine Konformation zu ändern, um mit anderen Stoffen Bindungen einzugehen. Würde es zutreffen, dass Agonist und Inhibitor aneinanderbinden, könnten diese sterisch vielleicht nicht mehr in die Bindungstasche passen und so zum verminderten Calciumsignal führen. Allerdings erklärt dies nicht warum so viele andere Stoffe aus der Substanzbibliothek keinen inhibitorischen Effekt auf TAS2R50 haben. So sind Naringin und Neohesperidin (Abbildung 36) zwar chemisch eng strukturverwandt, aber nur Naringin wirkt hemmend auf TAS2R50.

4.4 Die Charakterisierung des Inhibitionsmechanismus

Um die Wirkung der breitbandigen Antagonisten Chloroquin und Phenanthrolin in Abhängigkeit mit den Agonisten zu analysieren wurden Dosis-Wirkungs-Experimente durchgeführt. Sowohl Chloroquin als auch Phenanthrolin führten zu einer Reduktion des maximalen Rezeptorsignals und bei der höchsten Konzentration zu einer Erhöhung der EC_{50} -Werte. Somit können beide Substanzen als *insurmountable* (unüberwindbare) Antagonisten bezeichnet werden (Gaddum, 1957). Pharmakologisch kann dem ein orthosterischer oder allosterischer Mechanismus zu Grunde liegen (Kenakin, 2009). Während beim orthosterischen Antagonismus beide Liganden um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren und so zu einer verminderten Rezeptorantwort führen, binden beim allosterischen Mechanismus die pharmakologisch wirkenden Stoffe an zwei unterschiedlichen Rezeptordomänen, wodurch der Rezeptor seine Konformation ändert. Allosterische Antagonisten wirken aufgrund der Änderung der Rezeptorkonformation auf jeden Agonisten spezifisch, wohingegen orthosterische Inhibitoren alle Liganden blockieren (Kenakin, 2012). Durch weitere Experimente zum Beispiel mit unterschiedlichen Agonisten könnte der Inhibitionsmechanismus weiter eingegrenzt werden. So konnte durch Dosis-Wirkungs-Experimente und Punktmutationen des TAS2R16 festgestellt werden, dass Probenecid ein unüberwindbarer Antagonist ist, welcher an einer intrazellulären Bindungsstelle des TAS2R16 wirkt (Greene et al., 2011). Dahingegen zeigten Experimente mit dem Antagonisten GIV3727 am TAS2R31 und -R43, dass dieser unüberwindbare Inhibitor wahrscheinlich an derselben orthosterischen Bindungsstelle wie die verwendeten Agonisten bindet (Slack et al., 2010).

Nach den Autoren einer Studie über die Bindungsmodalitäten von TAS2R31, -R43 und TAS2R46 besitzen diese eine orthosterische Bindungstasche für deren zahlreiche, strukturell sehr unterschiedlichen Agonisten, wobei die Agonisten zwar spezifische Kontaktpunkte

besetzen diese aber auch für die Bindung anderer Agonisten verantwortlich sind und teilweise überlappen (Brockhoff et al., 2010). Sandal und Kollegen fanden Hinweise auf eine vestibuläre Bindungstasche, welche nach den Autoren mit verantwortlich zeichnet für die Selektivität der Rezeptoren (Sandal et al., 2015).

4.5 Das Zusammenspiel der TAS2R-Liganden und deren Bedeutung

Bitterstoffe sind in unserer Umwelt ubiquitär verbreitet. Sie befinden sich in unserer Nahrung, in Medikamenten als pharmakologische Wirkstoffe, in zahlreichen Pflanzen und vielem mehr (Kingsbury, 1964; Ley, 2008; Vetter, 2000). Schätzungsweise mehrere tausend Pflanzenarten nutzen bitter schmeckende Substanzen als Schutz vor Fraßfeinden (Vetter, 2000). Da der Bittergeschmack einen aversiven gustofazialen Reflex auslöst wird dieser allgemein hin als wichtiger Schutzmechanismus vor toxischen Stoffen angesehen (Ganchrow et al., 1983; Lindemann, 1996). Aber auch gesundheitsförderliche Substanzen wie viele sekundäre Pflanzenmetabolite und Zuckerersatzstoffe können eine bittere Note aufweisen (Craig, 1997; Schiffmann et al., 1997). Die Lebensmittel- und Pharmaindustrie unternimmt große Anstrengungen, um unerwünschte bittere Noten von Produkten zu überdecken (Ley, 2008; Sohi et al., 2004; Verbeke, 2006). Nur sind die bis jetzt bekannten Methoden nicht für alle Produkte anwendbar oder können den Bittergeschmack nicht vollständig maskieren (Astray et al., 2009; Binello et al. 2004; Ley, 2008; Shet und Vaidya, 2013). Um die Verbraucherakzeptanz von gesunden und kalorienreduzierten Nahrungsmitteln und auch von bitter schmeckenden Medikamenten zu erhöhen, könnte der Einsatz von Hemmstoffen des Bittergeschmacks beitragen.

Pflanzensorten, welche so gezüchtet worden sind, dass sie weniger bitter schmecken sind anfälliger für Krankheiten. Dies könnte auf eine geringere Konzentration von bitter schmeckenden sekundären Pflanzenstoffen zurückzuführen sein, da diese von Pflanzen zur Abwehr von Pathogenen genutzt werden (Benavente-Garcia et al., 1997; Drewnowski und Gomez, 2000). Mit der alternativen Einführung von Hemmstoffen des menschlichen Bittergeschmacks könnte eine Rückkehr zur Urform erfolgen, was dann womöglich sowohl einen höheren Gehalt an gesunden Inhaltsstoffen für den Verbraucher, als auch einen geringeren Einsatz von Pestiziden bedeuten könnte (Drewnowski und Gomez, 2000).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen auf ein neues Maß an Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung schließen und bestätigen das komplexe Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Eigenschaften von Bitterstoffen, welche bereits für einzelne Substanzen beobachtet werden konnten (Brockhoff et al., 2011). Die Ausbildung zahlreicher

Bittergeschmacksrezeptoren mit teilweise überlappenden Agonistenspektren stellt womöglich eine wichtige Strategie dar um das Nicht-Erkennen von toxischen Substanzen zu verhindern (Behrens und Meyerhof, 2013). Allerdings macht dies die Entwicklung syntetischer Bittergeschmackshemmstoffe umso schwieriger, wenn man der Annahme folgt, dass Stoffe, welche in die Bindungstasche von einigen TAS2Rs passen und die Aktivierung durch Agonisten verhindern, bei anderen TAS2Rs eine aktivierende Wirkung haben.

In unserer Nahrung können sich durchaus mehrere Bitterstoffe gleichzeitig befinden (Belitz und Wieser, 1985; Hofmann, 2009). Zum Beispiel enthält Wermuttee mehrere Bitterstoffe, welche nachweislich als Agonisten und Antagonisten überlappender Teilmengen von Bittergeschmacksrezeptoren agieren (Brockhoff et al., 2011). Des Weiteren muss bei der Entwicklung von Hemmstoffen in Betracht gezogen werden, dass nicht alle Menschen die gleiche genetische Ausstattung an TAS2Rs besitzen (Roudnitzky et al., 2015) und es aufgrund dessen individuelle Unterschiede in der Wahrnehmung von Bitterstoffen und somit möglicherweise auch bei Antagonisten geben könnte. Sollten die Variationen im Rezeptoraufbau die Bindungsstelle des Antagonisten betreffen könnte dieser nicht mehr binden und wäre somit wirkungslos. Ein weiterer Aspekt ist das Vorkommen von Bittergeschmacksrezeptoren in extraoralem Gewebe, wie zum Beispiel im Gehirn (Singh et al., 2011), in den Atemwegen (Shah et al., 2009) im Magen-Darm-Trakt (Behrens und Meyerhof, 2011) und im Herzen (Foster et al., 2013). Noch sind nicht alle physiologischen Funktionen und Wirkweisen der extraoralen TAS2Rs aufgeklärt. Allerdings konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass Koffein mittels Bittergeschmacksrezeptoren im Mund und Magen regulierend auf die Magensäuresekretion wirkt (Liszt et al., 2017). So ist es durchaus möglich, dass in Nahrungsmitteln eingesetzte breitbandige Inhibitoren möglicherweise zu unerwünschten Nebeneffekten führen, da sie eventuell auch die Aktivierung von TAS2Rs in anderen Geweben beeinflussen könnten. Von vielen Bitterstoffen ist bekannt, dass sie pharmakologisch wirksam sind. Zum Beispiel ist Vorsicht geboten bei der gleichzeitigen Aufnahme von Pampelmusen-Saft und Medikamenten. Ein Bestandteil des Fruchtsafts ist der Bitterstoff und TAS2R50-Antagonist Naringin. Dessen Abbauprodukte führen zu einer Hemmung von Zytochrom P450-Isozymen (Drewnowski und Rock, 1995; Fuhr und Kummert, 1995). Medikamente werden nach der Aufnahme enzymatisch gespalten, fehlen die Enzyme führt dies zu einer erhöhten Konzentration des Wirkstoffs. Für über 85 Medikamente ist die Wechselwirkung mit Pampelmusen-Saft bekannt (Hanley et al., 2011). Eines davon ist das Cholesterin senkende Mittel Simvastatin dessen Bioverfügbarkeit bis zu 12-fach ansteigt bei gleichzeitiger Einnahme mit dem Fruchtsaft und das dadurch zu Leberschäden führen kann (Chen et al., 2018; Lilja und Kivistö, 2000). Falls die Aufnahme von Medikamenten auch durch Bittergeschmacksrezeptoren vermittelt wird, könnte hier eine weitere Ursache für die Wechselwirkung liegen.

Gleichwohl könnten spezifisch wirkende Antagonisten wichtige pharmakologische Wirkstoffe darstellen. Antagonisten anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren finden bereits Anwendung in der Behandlung von Parkinson, Psychosen, Asthma und vielem mehr (Tyndall und Sandilya, 2005). So ist auch hier der gezielte Einsatz von Antagonisten der TAS2Rs im extraoralem Gewebe denkbar.

Zu bedenken ist auch die zeitliche Abfolge der Aufnahme. So zeigte sich einer Studie, dass drei Methoxy-Flavone (Roland et al., 2014) auf TAS2R14 eine inhibitorische Wirkung haben. Interessanterweise geschah dies nicht bei der simultanen Zugabe der Substanzen, sondern nur wenn diese mehrere Sekunden vor dem Agonisten appliziert wurden (Roland et al., 2014). Damit stellt sich die Frage, wie wichtig die Reihenfolge ist, in der die Bitterstoffe an die Rezeptoren gelangen und ob dies Einfluss auf die hemmende Wirkung von Antagonisten bei der Nahrungs- bzw. Medikamentenaufnahme nach sich zieht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Wahrnehmung von Bitterstoffen um ein Vielfaches komplexer ist als bislang angenommen. Das gleichzeitige Wirken von Bittersubstanzen als Agonist und Antagonist verschiedener teils überlappender Gruppen von Bittergeschmacksrezeptoren scheint nicht nur auf einzelne Substanzen beschränkt zu sein, sondern ein allgemeines Prinzip darzustellen. Zur weiteren Aufklärung der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung und deren physiologischer Funktion in extraoralem Gewebe könnten TAS2R-Antagonisten als wichtiges mechanistisches Werkzeug dienen. Des Weiteren könnten Antagonisten der Bitterrezeptoren nicht nur dazu verwendet werden um die Verbraucherakzeptanz von bitter schmeckenden gesunden Lebensmitteln und Medikamenten zu erhöhen, sondern selbst auch als pharmakologische Wirkstoffe eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Bitterstoffe sind ubiquitär in der Natur und unserer täglichen Umwelt verbreitet und zeichnen sich durch eine ausgesprochen hohe chemische Diversität aus (Barratt-Fornell et al., 2002; Belitz und Wieser, 1985; Biere et al., 2004; DuBois et al., 2008; Edreva et al., 2008). Es wird angenommen, dass sich die Bittergeschmackswahrnehmung als eine Warnfunktion vor sich in der Nahrung befindlichen gesundheitsschädlichen Stoffen entwickelt hat (Lindemann, 1996). Die Wahrnehmung der Bitterstoffe erfolgt über 25 G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von denen sich die bis dato 21 deorphanisierten TAS2Rs (*taste 2 receptor*) durch ein individuelles Agonistenspektrum auszeichnen (Meyerhof et al., 2010a). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass fast die Hälfte der Testverbindungen mehr als einen TAS2R aktivierten (Meyerhof et al., 2010). In einer Studie von Brockhoff und Kollegen (2011) wurden zwei Substanzen gefunden, welche sowohl als Agonisten sowie auch als Antagonisten verschiedener Bittergeschmacksrezeptoren identifiziert wurden (Brockhoff et al., 2011).

In Anknüpfung an diese Resultate sollte untersucht werden, ob bei Bitterstoffen das gleichzeitige fungieren als Antagonist und Agonist unterschiedlicher Teilmengen von Bittergeschmacksrezeptoren ein häufiges Phänomen darstellt. Dazu wurden 52 Substanzen als Antagonisten auf acht Rezeptoren (TAS2R9, -R10, -R14, -R16, -R38, -R43, -R46, -R50), welche aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften ausgewählt wurden, untersucht. Mittels heterologer Expression der TAS2Rs in HEK 293T-Zellen, welche stabil mit der G-Protein $G\alpha_{16}$ gust44-Unterheit transfiziert waren, wurden funktionelle Calciumanalysen durchgeführt. Dabei wurde die Höhe der relativen Fluoreszenzsignale zwischen der alleinigen Applikation des Agonisten und der simultanen Zugabe des Agonisten und der Testsubstanzen verglichen.

In der vorliegenden Arbeit konnten 20 bisher unbekannte Antagonisten von humanen Bittergeschmacksrezeptoren identifiziert werden. Diese zeigten zumeist eine individuelle Ausprägung der inhibitorischen Potenz und Effizienz auf die Rezeptoren, wobei acht Substanzen auf mehr als einen TAS2R als Antagonisten wirkten. Drei Substanzen (Chloroquin, Allylthiocyanat, Phenanthrolin) konnten als breitbandig wirkende Inhibitoren identifiziert werden, welche das Agonisten-induzierte Calciumsignal von sechs bis acht Bittergeschmacksrezeptoren reduzierten. Dosis-Wirkungs-Experimente zeigten, dass Chloroquin (auf TAS2R16 und -R38) und Phenanthrolin (auf TAS2R10 und -R46) als *insurmountable* Antagonisten fungierten. Auf TAS2R50, für den nur zwei Agonisten bekannt sind (Meyerhof et al., 2010), zeigten 14 der Testsubstanzen ein antagonistisches Potential.

Die Substanz Hardwickische Säure (FL101237) wurde auf alle 21 deorphanisierten TAS2Rs als Antagonist getestet. Auf 19 Rezeptoren zeigte FL101237 eine inhibitorische Wirkung,

wobei das relative Fluoreszenzsignal von elf TAS2Rs durch die simultane Applikation des Agonisten und FL101237 vollständig inhibiert wurde. Für TAS2R1 stellte sich FL101237 als Agonist, für TAS2R46 als partieller Agonist, heraus.

Erstmalig konnte in der vorliegenden Arbeit in diesem Umfang gezeigt werden, dass Bittersubstanzen gleichzeitig als Agonisten und Antagonisten verschiedener teils überlappender Teilmengen von Bittergeschmacksrezeptoren fungieren können. Das Ligandenspektrum der TAS2Rs ist vermutlich größer als bisher angenommen und die Ergebnisse dieser Arbeit zeichnen ein neues Bild der Komplexität der Bittergeschmacksstoffwahrnehmung. Es scheint, dass der evolutionäre Druck Bittersubstanzen zu erkennen zu der Ausbildung der Vielzahl an Rezeptoren mit überlappenden Agonistenspektren geführt hat, um sicher zu stellen, dass toxische Substanzen auch vermengt mit Bitterinhibitoren erkannt werden (Behrens und Meyerhof, 2013).

Antagonisten des Bittergeschmacks könnten nicht nur dazu beitragen die Verbraucherakzeptanz von gesunden Lebensmitteln und Medikamenten zu erhöhen, sondern auch als mechanistische Werkzeuge zum gezielten Ausschalten einzelner oder Teilgruppen von TAS2Rs zur weiterer Aufklärung der Bittergeschmackswahrnehmung eingesetzt werden.

6. Summary

Among the five basic taste qualities, bitter taste is believed to protect from the ingestion of potentially toxic substances (Lindemann, 1996). In humans, about 25 functional bitter taste receptors (TAS2R) exist, which belong to the family of G protein-coupled receptors (Chandrashekar et al., 2010). In a previous study, two bitter substances were identified that are, on the one hand, TAS2R agonists and, on the other hand, are able to inhibit a different subset of bitter taste receptors. The occurrence of TAS2R antagonists in the same plant species that produces bitter agonists indicates that bitter taste perception is even more complex as previously believed (Brockhoff et al. 2011). The identification of these bitter antagonists raised the question of how widespread this phenomenon is.

Using heterologous expression of TAS2Rs in HEK 293T cells stably expressing the G-protein chimera G α 16gust44, the receptor response can be monitored via functional calcium imaging. In order to identify substances inhibiting TAS2Rs, calcium signals of the agonist applied alone to the cells compared to the application of the agonist premixed with test substance were analysed.

In total 52 bitter substances were screened on eight TAS2Rs (TAS2R9, -R10, -R14, -R16, -R38, -R43, -R46, -R50) with different tuning breadths. 20 substances were identified to be antagonists. Eight of these showed an inhibitory effect for two or more TAS2Rs. Strikingly, three compounds (Allylisothiocyanat, Chloroquin and Phenanthrolin) reduced the calcium signals of six or more TAS2Rs. By means of dose response experiments I demonstrated that Chloroquin (on TAS2R16 and -R38) and Phenanthrolin (on TAS2R10 and -R46) act as insurmountable antagonists. Strikingly, for TAS2R50 with three known agonists by far the most antagonists were identified.

Furthermore, the substance Hardwickic acid (FL101237) was tested for all 21 deorphanized TAS2Rs. FL101237 showed inhibitory effects on 19 TAS2Rs and even fully blocked the signal response for 11. In addition, FL101237 activated the TAS2R1 and acted as partial agonist on TAS2R46.

By examining TAS2Rs with different tuning breadths I observed that the number of presumed ligands, consisting of agonists and inhibitors, might be more similar than previously anticipated. In general, an obvious structural similarity among agonists and antagonist of the same receptor was not observed. Moreover, it can be concluded that bitter compounds frequently represent agonists and antagonists of different subsets of TAS2Rs, substantiating the notion that the overlapping spectra of activating and inhibiting substances of TAS2Rs is elevating the known complexity of bitter taste perception even further.

In the future antagonists could be useful tools for examining the perception of bitter substances and to inhibit the bitter off-taste of healthy food and drugs.

7. Literaturverzeichnis

- ADLER, E., HOON, M. A., MUELLER, K. L., CHANDRASHEKAR, J., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2000. A novel family of mammalian taste receptors. *Cell*, 100, 693-702.
- AMMON, C., SCHAFER, J., KREUZER, O. J. & MEYERHOF, W. 2002. Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem*, 110, 137-45.
- ASTRAYA, G., GONZALEZ-BARREIRO, C., MEJUTO, J. C., RIAL-OTERO, R. & SIMAL-GÁNDARA, J. 2009. A review on the use of cyclodextrins in foods. *Food Hydrocolloids*, 23, 1631-1640.
- ATTWOOD, T. K. & FINDLAY, J. B. 1994. Fingerprinting G-protein-coupled receptors. *Protein Eng*, 7, 195-203.
- BARRATT-FORNELL, A. & DREWNOWSKI, A. 2002. The Taste of Health: Nature's Bitter Gifts. *Nutr Today*, 37, 144-150.
- BARTEL, D. L., SULLIVAN, S. L., LAVOIE, E. G., SEVIGNY, J. & FINGER, T. E. 2006. Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *J Comp Neurol*, 497, 1-12.
- BEECHER, G. R. 1999. Phytonutrients' role in metabolism: effects on resistance to degenerative processes. *Nutr Rev*, 57, S3-6.
- BEHRENS, M., BLANK, K. & MEYERHOF, W. 2017a. Blends of Non-caloric Sweeteners Saccharin and Cyclamate Show Reduced Off-Taste due to TAS2R Bitter Receptor Inhibition. *Cell Chem Biol*, 24, 1199-1204 e2.
- BEHRENS, M., BROCKHOFF, A., BATRAM, C., KUHN, C., APPENDINO, G. & MEYERHOF, W. 2009. The human bitter taste receptor hTAS2R50 is activated by the two natural bitter terpenoids andrographolide and amarogentin. *J Agric Food Chem*, 57, 9860-6.
- BEHRENS, M., BROCKHOFF, A., KUHN, C., BUFE, B., WINNIG, M. & MEYERHOF, W. 2004. The human taste receptor hTAS2R14 responds to a variety of different bitter compounds. *Biochem Biophys Res Commun*, 319, 479-85.
- BEHRENS, M., FOERSTER, S., STAEHLER, F., RAGUSE, J. D. & MEYERHOF, W. 2007. Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *Journal of Neuroscience*, 27, 12630-12640.

- BEHRENS, M., GU, M., FAN, S., HUANG, C. & MEYERHOF, W. 2018a. Bitter substances from plants used in traditional Chinese medicine exert biased activation of human bitter taste receptors. *Chem Biol Drug Des*, 91, 422-433.
- BEHRENS, M., KORSCHING, S. I. & MEYERHOF, W. 2014. Tuning properties of avian and frog bitter taste receptors dynamically fit gene repertoire sizes. *Mol Biol Evol*, 31, 3216-27.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, M. 2017b. Physiological Aspects of Bitterness. In: Alani, M.; Eskin, M.N.A.(ed). *Bitterness: Perception, Chemistry and Food Processing, First Edition*, John Wiley & Sons.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, M. 2017c. The vertebrate gustatory system. In: Guichard, E.; Salles, C.; Morzel, M.; Le Bon, A. (ed). *Flavour: From food to perception*, John Wiley & Sons, 57-78.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. 2011. Gustatory and extragustatory functions of mammalian taste receptors. *Physiol Behav*, 105, 4-13.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. 2013. Bitter taste receptor research comes of age: From characterization to modulation of TAS2Rs. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24, 215-221.
- BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. 2018b. Vertebrate Bitter Taste Receptors: Keys for Survival in Changing Environments. *J Agric Food Chem*, 66, 2204-2213.
- BEIDLER, L. M. & SMALLMAN, R. L. 1965. Renewal of cells within taste buds. *J Cell Biol*, 27, 263-72.
- BELITZ, H. D. & WIESER, H. 1985. Bitter compounds: Occurrence and structure-activity relationships. *Food Reviews International*, 1, 271-354.
- BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., MARIN, F. R., ORTUNO, A. & RIO, J. A. 1997. Uses and Properties of Citrus Flavonoids. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45, 4505-4515.
- BERGAMOA, A. B., DA SILVA, J. A. F. & DE JESUS, D. P. 2011. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in soft drinks and tabletop sweetener formulations by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Food Chemistry*, 124, 1714-1717.
- BIERE, A., MARAK, H. B. & VAN DAMME, J. M. 2004. Plant chemical defense against herbivores and pathogens: generalized defense or trade-offs? *Oecologia*, 140, 430-41.

- BINELLO, A., CRAVOTTO, G., NANO, G. M. & SPAGLIARDI, P. 2004. Synthesis of chitosan–cyclodextrin adducts and evaluation of their bitter-masking properties. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 394-400.
- BORN, S., LEVIT, A., NIV, M. Y., MEYERHOF, W. & BEHRENS, M. 2013. The human bitter taste receptor TAS2R10 is tailored to accommodate numerous diverse ligands. *J Neurosci*, 33, 201-13.
- BRESLIN, P. A. & BEAUCHAMP, G. K. 1997. Salt enhances flavour by suppressing bitterness. *Nature*, 387, 563.
- BROCKHOFF, A., BEHRENS, M., MASSAROTTI, A., APPENDINO, G. & MEYERHOF, W. 2007. Broad tuning of the human bitter taste receptor hTAS2R46 to various sesquiterpene lactones, clerodane and labdane diterpenoids, strychnine, and denatonium. *J Agric Food Chem*, 55, 6236-43.
- BROCKHOFF, A., BEHRENS, M., NIV, M. Y. & MEYERHOF, W. 2010. Structural requirements of bitter taste receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 11110-5.
- BROCKHOFF, A., BEHRENS, M., ROUDNITZKY, N., APPENDINO, G., AVONTO, C. & MEYERHOF, W. 2011. Receptor agonism and antagonism of dietary bitter compounds. *J Neurosci*, 31, 14775-82.
- BUFE, B., BRESLIN, P. A., KUHN, C., REED, D. R., THARP, C. D., SLACK, J. P., KIM, U. K., DRAYNA, D. & MEYERHOF, W. 2005. The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol*, 15, 322-7.
- BUFE, B., HOFMANN, T., KRAUTWURST, D., RAGUSE, J. D. & MEYERHOF, W. 2002. The human TAS2R16 receptor mediates bitter taste in response to beta-glucopyranosides. *Nat Genet*, 32, 397-401.
- CALVINO, A. M., GARCIA-MEDINA, M. R., COMETTO-MUNIZ, J. E. & RODRIGUEZ, M. B. 1993. Perception of sweetness and bitterness in different vehicles. *Percept Psychophys*, 54, 751-8.
- CHANDRASHEKAR, J., HOON, M. A., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2006. The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444, 288-94.
- CHANDRASHEKAR, J., KUHN, C., OKA, Y., YARMOLINSKY, D. A., HUMMLER, E., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2010. The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature*, 464, 297-301.
- CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. 2010. The cell biology of taste. *J Cell Biol*, 190, 285-96.

- CHEN, M., ZHOU, S. Y., FABRIAGA, E., ZHANG, P. H. & ZHOU, Q. 2018. Food-drug interactions precipitated by fruit juices other than grapefruit juice: An update review. *J Food Drug Anal*, 26, S61-S71.
- CONGREVE, M., LANGMEAD, C. J., MASON, J. S. & MARSHALL, F. H. 2011. Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors. *J Med Chem*, 54, 4283-311.
- CRAIG, W. J. 1997. Phytochemicals: guardians of our health. *J Am Diet Assoc*, 97, S199-204.
- DEFAZIO, R. A., DVORYANCHIKOV, G., MARUYAMA, Y., KIM, J. W., PEREIRA, E., ROPER, S. D. & CHAUDHARI, N. 2006. Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *J Neurosci*, 26, 3971-80.
- DELWICHE, J. 2004. The impact of perceptual interactions on perceived flavor. *Food Quality and Preference*, 15, 137-146.
- DESHPANDE, D. A., WANG, W. C., MCILMOYLE, E. L., ROBINETT, K. S., SCHILLINGER, R. M., AN, S. S., SHAM, J. S. & LIGGETT, S. B. 2010. Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med*, 16, 1299-304.
- DEUPI, X. & KOBILKA, B. 2007. Activation of G protein-coupled receptors. *Adv Protein Chem*, 74, 137-66.
- DJIMDE, A., DOUMBO, O. K., CORTESE, J. F., KAYENTAO, K., DOUMBO, S., DIOURTE, Y., COULIBALY, D., DICKO, A., SU, X. Z., NOMURA, T., FIDOCK, D. A., WELLEMS, T. E. & PLOWE, C. V. 2001. A molecular marker for chloroquine-resistant falciparum malaria. *N Engl J Med*, 344, 257-63.
- DONG, D., JONES, G. & ZHANG, S. 2009. Dynamic evolution of bitter taste receptor genes in vertebrates. *BMC Evol Biol*, 9, 12.
- DOTSON, C. D., ZHANG, L., XU, H., SHIN, Y. K., VIGUES, S., OTT, S. H., ELSON, A. E., CHOI, H. J., SHAW, H., EGAN, J. M., MITCHELL, B. D., LI, X., STEINLE, N. I. & MUNGER, S. D. 2008. Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One*, 3, e3974.
- DREWNOWSKI, A. & GOMEZ-CARNEROS, C. 2000. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. *Am J Clin Nutr*, 72, 1424-35.
- DREWNOWSKI, A. & ROCK, C. L. 1995. The influence of genetic taste markers on food acceptance. *Am J Clin Nutr*, 62, 506-11.

- EDREVA, A., VELIKOVA, V., TSONEV, T., DAGNON, S., GÜREL, A., AKTAŞ, L. & GESHEVA, E. 2008. STRESS-PROTECTIVE ROLE OF SECONDARY METABOLITES: DIVERSITY OF FUNCTIONS AND MECHANISMS. *Gen. Appl. Plant Physiology*, 34, 67-78.
- ERNST, I. M., WAGNER, A. E., SCHUEMANN, C., STORM, N., HOPPNER, W., DORING, F., STOCKER, A. & RIMBACH, G. 2011. Allyl-, butyl- and phenylethyl-isothiocyanate activate Nrf2 in cultured fibroblasts. *Pharmacol Res*, 63, 233-40.
- FABRICANT, D. S. & FARNSWORTH, N. R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect*, 109 Suppl 1, 69-75.
- FAROMBI, E. O. & OWOEYE, O. 2011. Antioxidative and chemopreventive properties of *Vernonia amygdalina* and *Garcinia biflavonoid*. *Int J Environ Res Public Health*, 8, 2533-55.
- FINGER, T. E., BOTTGER, B., HANSEN, A., ANDERSON, K. T., ALIMOHAMMADI, H. & SILVER, W. L. 2003. Solitary chemoreceptor cells in the nasal cavity serve as sentinels of respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8981-6.
- FLETCHER, J. N., KINGHORN, A. D., SLACK, J. P., MCCLUSKEY, T. S., ODLEY, A. & JIA, Z. 2011. In vitro evaluation of flavonoids from *Eriodictyon californicum* for antagonist activity against the bitterness receptor hTAS2R31. *J Agric Food Chem*, 59, 13117-21.
- FLORIANO, W. B., HALL, S., VAIDEHI, N., KIM, U., DRAYNA, D. & GODDARD, W. A., 3RD 2006. Modeling the human PTC bitter-taste receptor interactions with bitter tastants. *J Mol Model*, 12, 931-41.
- FORD, E. S. & MOKDAD, A. H. 2001. Fruit and vegetable consumption and diabetes mellitus incidence among U.S. adults. *Prev Med*, 32, 33-9.
- FOSTER, S. R., PORRELLO, E. R., PURDUE, B., CHAN, H.-W., VOIGT, A., FRENZEL, S., HANNAN, R. D., MORITZ, K. M., SIMMONS, D. G. & MOLENAAR, P. 2013. Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One*, 8, e64579.
- FREDRIKSSON, R., LAGERSTROM, M. C., LUNDIN, L. G. & SCHIOTH, H. B. 2003. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*, 63, 1256-72.
- FUHR, U. & KUMMERT, A. L. 1995. The fate of naringin in humans: a key to grapefruit juice-drug interactions? *Clin Pharmacol Ther*, 58, 365-73.
- GADDUM, J. H. 1957. Theories of drug antagonism. *Pharmacol Rev*, 9, 211-8.

- GALINDO-CUSPINERA, V., WINNIG, M., BUFE, B., MEYERHOF, W. & BRESLIN, P. A. 2006. A TAS1R receptor-based explanation of sweet 'water-taste'. *Nature*, 441, 354-7.
- GANCHROW, J. R., STEINER, J. E. & DAHER, M. 1983. Neonatal facial expressions in response to different qualities and intensities of gustatory stimuli. *Infant Behavior and Development*, 6, 189-200.
- GAUDETTE, N. J. & PICKERING, G. J. 2013. Modifying bitterness in functional food systems. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53, 464-81.
- GEE, K. R., BROWN, K. A., CHEN, W. N., BISHOP-STEWART, J., GRAY, D. & JOHNSON, I. 2000. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium*, 27, 97-106.
- GLENDINNING, J. I. 1994. Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiology & behavior*, 56, 1217-1227.
- GREENE, T. A., ALARCON, S., THOMAS, A., BERDOUGO, E., DORANZ, B. J., BRESLIN, P. A. & RUCKER, J. B. 2011. Probenecid inhibits the human bitter taste receptor TAS2R16 and suppresses bitter perception of salicin. *PLoS One*, 6, e20123.
- HANLEY, M. J., CANCELON, P., WIDMER, W. W. & GREENBLATT, D. J. 2011. The effect of grapefruit juice on drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 7, 267-86.
- HAUSER, A. S., ATTWOOD, M. M., RASK-ANDERSEN, M., SCHIOTH, H. B. & GLORIAM, D. E. 2017. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 829-842.
- HAYES, J. E., WALLACE, M. R., KNOPIK, V. S., HERBSTMAN, D. M., BARTOSHUK, L. M. & DUFFY, V. B. 2010. Allelic variation in TAS2R bitter receptor genes associates with variation in sensations from and ingestive behaviors toward common bitter beverages in adults. *Chem Senses*, 36, 311-9.
- HE, K., HU, F. B., COLDITZ, G. A., MANSON, J. E., WILLETT, W. C. & LIU, S. 2004. Changes in intake of fruits and vegetables in relation to risk of obesity and weight gain among middle-aged women. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 28, 1569-74.
- HECK, G. L., MIERSON, S. & DESIMONE, J. A. 1984. Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*, 223, 403-5.
- HOFMANN, T. 2005. Taste-Active Maillard Reaction Products: The "Tasty" World of Nonvolatile Maillard Reaction Products. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 20-29.
- HOMEWOOD, C. A., WARHURST, D. C., PETERS, W. & BAGGALEY, V. C. 1972. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature*, 33, 50-52.

- HORNE, J., LAWLESS, H. T., SPEIRS, W. & SPOSATO, D. 2002. Bitter taste of saccharin and acesulfame-K. *Chem Senses*, 27, 31-8.
- HUANG, Y. A., MARUYAMA, Y., STIMAC, R. & ROPER, S. D. 2008. Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *J Physiol*, 586, 2903-12.
- HUFFMAN, M. A. & SEIFU, M. 1989. Observations on the illness and consumption of a possibly medicinal plant *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*, 30, 51-63.
- HUFFMANN, M. A. 1997. Current Evidence for Self-Medication in Primates: A Multidisciplinary Perspective. *YEARBOOK OF PHYSICAL ANTHROPOLOGY*, 40, 171-200.
- HUNG, H. C., JOSHIPURA, K. J., JIANG, R., HU, F. B., HUNTER, D., SMITH-WARNER, S. A., COLDITZ, G. A., ROSNER, B., SPIEGELMAN, D. & WILLETT, W. C. 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *J Natl Cancer Inst*, 96, 1577-84.
- KEAST, R. S. & BRESLIN, P. A. 2002. Modifying the bitterness of selected oral pharmaceuticals with cation and anion series of salts. *Pharm Res*, 19, 1019-26.
- KEAST, R. S., CANTY, T. M. & BRESLIN, P. A. 2004. The influence of sodium salts on binary mixtures of bitter-tasting compounds. *Chem Senses*, 29, 431-9.
- KENAKIN, T., JENKINSON, S. & WATSON, C. 2006. Determining the potency and molecular mechanism of action of insurmountable antagonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 319,710-23.
- KENAKIN, T. P. 2009. Orthosteric Drug Antagonism. In: *Kenakin; T.P. (ed). A Pharmacology Primer. Fourth Edition*, Elsevier, 119-154.
- KENAKIN, T. P. 2012. Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. *Br J Pharmacol*, 165, 1659-1669.
- KIM, M. J., SON, H. J., KIM, Y., MISAKA, T. & RHYU, M. R. 2015. Umami-bitter interactions: the suppression of bitterness by umami peptides via human bitter taste receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 456, 586-90.
- KINGSBURY, J. M. 1964. *Poisonous Plants of the United States and Canada*. 98.
- KLAENHAMMER, T. R. 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. *J Nutr*, 130, 415S-416S.
- KOMINEK, L. A. 1975. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: alleviation of end-product inhibition by dialysis-extraction fermentation. *Antimicrob Agents Chemother*, 7, 861-3.
- KOSHIMIZU, K., OHIGASHI, H. & HUFFMAN, M. A. 1994. Use of *Vernonia amygdalina* by wild chimpanzee: possible roles of its bitter and related constituents. *Physiol Behav*, 56, 1209-16.

- KUHN, C., BUFE, B., BATRAM, C. & MEYERHOF, W. 2010. Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*, 35, 395-406.
- KUHN, C., BUFE, B., WINNIG, M., HOFMANN, T., FRANK, O., BEHRENS, M., LEWTSCHENKO, T., SLACK, J. P., WARD, C. D. & MEYERHOF, W. 2004. Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci*, 24, 10260-5.
- LAWTON, D. M., FURNESS, D. N., LINDEMANN, B. & HACKNEY, C. M. 2000. Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *Eur J Neurosci*, 12, 3163-71.
- LEVIT, A., NOWAK, S., PETERS, M., WIENER, A., MEYERHOF, W., BEHRENS, M. & NIV, M. Y. 2014. The bitter pill: clinical drugs that activate the human bitter taste receptor TAS2R14. *FASEB J*, 28, 1181-97.
- LEY, J. 2008. Masking Bitter Taste by Molecules. *Chem. Percept.*, 1, 58-77.
- LI, D. & ZHANG, J. 2014. Diet shapes the evolution of the vertebrate bitter taste receptor gene repertoire. *Mol Biol Evol*, 31, 303-9.
- LILJA, J. J., KIVISTO, K. T. & NEUVONEN, P. J. 2000. Duration of effect of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the CYP3A4 substrate simvastatin. *Clin Pharmacol Ther*, 68, 384-90.
- LIN, W., FINGER, T. E., ROSSIER, B. C. & KINNAMON, S. C. 1999. Epithelial Na⁺ channel subunits in rat taste cells: localization and regulation by aldosterone. *J Comp Neurol*, 405, 406-20.
- LINDEMANN, B. 1996. Chemoreception: tasting the sweet and the bitter. *Curr Biol*, 6, 1234-7.
- LINDEMANN, B. 2001. Receptors and transduction in taste. *Nature*, 413, 219-25.
- LISZT, K. I., LEY, J. P., LIEDER, B., BEHRENS, M., STOGER, V., REINER, A., HOCHKOGLER, C. M., KOCK, E., MARCHIORI, A., HANS, J., WIDDER, S., KRAMMER, G., SANGER, G. J., SOMOZA, M. M., MEYERHOF, W. & SOMOZA, V. 2017. Caffeine induces gastric acid secretion via bitter taste signaling in gastric parietal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, E6260-E6269.
- LOSSOW, K., HUBNER, S., ROUDNITZKY, N., SLACK, J. P., POLLASTRO, F., BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. 2016. Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *J Biol Chem*, 291, 15358-77.

- MALIK, V. S., SCHULZE, M. B. & HU, F. B. 2006. Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 84, 274–288.
- MALKI, A., FIEDLER, J., FRICKE, K., BALLWEG, I., PFAFFL, M. W. & KRAUTWURST, D. 2015. Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes. *J Leukoc Biol*, 97, 533-45.
- MATSUNAMI, H., MONTMAYEUR, J. P. & BUCK, L. B. 2000. A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, 404, 601-4.
- MCCHESENEY, J. D., CLARK, A. M. & SILVEIRA, E. R. 1991. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. *J Nat Prod*, 54, 1625-33.
- MEYERHOF, W. 2005. Elucidation of mammalian bitter taste. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 154, 37-72.
- MEYERHOF, W., BATRAM, C., KUHN, C., BROCKHOFF, A., CHUDOBA, E., BUFE, B., APPENDINO, G. & BEHRENS, M. 2010a. The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*, 35, 157-70.
- MEYERHOF, W., BEHRENS, M., BROCKHOFF, A., BUFE, B. & KUHN, C. 2005. Human bitter taste perception. *Chem Senses*, 30 Suppl 1, i14-5.
- MEYERHOF, W., BORN, S., BROCKHOFF, A. & BEHRENS, M. 2010b. Molecular biology of mammalian bitter taste receptors. A review. *Flavour and Fragrance*.
- MIGUET, L., ZHANG, Z. & GRIGOROV, M. G. 2006. Computational studies of ligand-receptor interactions in bitter taste receptors. *J Recept Signal Transduct Res*, 26, 611-30.
- MILLER, I. J. 1995. Anatomy of the peripheral taste system. In: Doty R.L.(ed). *Handbook of Olfaction and Gustation*, Marcel Dekker, 521–547.
- NELSON, G., CHANDRASHEKAR, J., HOON, M. A., FENG, L., ZHAO, G., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2002. An amino-acid taste receptor. *Nature*, 416, 199-202.
- NELSON, G., HOON, M. A., CHANDRASHEKAR, J., ZHANG, Y., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, 106, 381-90.
- OFFERMANN, S. & SIMON, M. I. 1995. G alpha 15 and G alpha 16 couple a wide variety of receptors to phospholipase C. *J Biol Chem*, 270, 15175-80.
- OKA, Y., BUTNARU, M., BUCHHOLTZ, L. V., RYBA, N. J. & ZUKER, C. S. 2013. High salt recruits aversive taste pathways. *Nature*, 000, 1-4.

- ORSMARK-PIETRAS, C., JAMES, A., KONRADSEN, J. R., NORDLUND, B., SODERHALL, C., PULKKINEN, V., PEDROLETTI, C., DAHAM, K., KUPCZYK, M., DAHLEN, B., KERE, J., DAHLEN, S. E., HEDLIN, G. & MELEN, E. 2013. Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics. *Eur Respir J*, 42, 65-78.
- PERRY, C. M. 2010. Maraviroc: a review of its use in the management of CCR5-tropic HIV-1 infection. *Drugs*, 70, 1189-213.
- PRONIN, A. N., TANG, H., CONNOR, J. & KEUNG, W. 2004. Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem Senses*, 29, 583-93.
- PRONIN, A. N., XU, H., TANG, H., ZHANG, L., LI, Q. & LI, X. 2007. Specific alleles of bitter receptor genes influence human sensitivity to the bitterness of aloin and saccharin. *Curr Biol*, 17, 1403-8.
- PYDI, S. P., JAGGUPILLI, A., NELSON, K. M., ABRAMS, S. R., BHULLAR, R. P., LOEWEN, M. C. & CHELIKANI, P. 2015. Abscisic Acid Acts as a Blocker of the Bitter Taste G Protein-Coupled Receptor T2R4. *Biochemistry*, 54, 2622-31.
- PYDI, S. P., SOBOTKIEWICZ, T., BILLAKANTI, R., BHULLAR, R. P., LOEWEN, M. C. & CHELIKANI, P. 2014. Amino acid derivatives as bitter taste receptor (T2R) blockers. *J Biol Chem*, 289, 25054-66.
- REICHLING, C., MEYERHOF, W. & BEHRENS, M. 2008. Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation. *J Neurochem*, 106, 1138-48.
- RIBOLI, E. & NORAT, T. 2003. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr*, 78, 559S-569S.
- ROLAND, W. S., GOUKA, R. J., GRUPPEN, H., DRIESSE, M., VAN BUREN, L., SMIT, G. & VINCKEN, J. P. 2014. 6-methoxyflavanones as bitter taste receptor blockers for hTAS2R39. *PLoS One*, 9, e94451.
- ROMPLER, H., STAUBERT, C., THOR, D., SCHULZ, A., HOFREITER, M. & SCHONEBERG, T. 2007. G protein-coupled time travel: evolutionary aspects of GPCR research. *Mol Interv*, 7, 17-25.
- ROSENBAUM, D. M., RASMUSSEN, S. G. & KOBILKA, B. K. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459, 356-63.
- ROUDNITZKY, N., BEHRENS, M., ENGEL, A., KOHL, S., THALMANN, S., HUBNER, S., LOSSOW, K., WOODING, S. P. & MEYERHOF, W. 2015. Receptor Polymorphism and Genomic Structure Interact to Shape Bitter Taste Perception. *Plos Genetics*, 11.

- ROUDNITZKY, N., RISSO, D., DRAYNA, D., BEHRENS, M., MEYERHOF, W. & WOODING, S. P. 2016. Copy Number Variation in TAS2R Bitter Taste Receptor Genes: Structure, Origin, and Population Genetics. *Chem Senses*, 41, 649-59.
- ROUDNITZKY, N., THALMANN, S., KOHL, S., ENGEL, A., WOODING, S., BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. 2011. Genetic basis for variability in bitter taste perception. *Chemical Senses*, 36, E28-E29.
- 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.
- SAKURAI, T., MISAKA, T., ISHIGURO, M., MASUDA, K., SUGAWARA, T., ITO, K., KOBAYASHI, T., MATSUO, S., ISHIMARU, Y., ASAKURA, T. & ABE, K. 2010. Characterization of the beta-D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16. *J Biol Chem*, 285, 28373-8.
- SANDAL, M., BEHRENS, M., BROCKHOFF, A., MUSIANI, F., GIORGETTI, A., CARLONI, P. & MEYERHOF, W. 2015. Evidence for a Transient Additional Ligand Binding Site in the TAS2R46 Bitter Taste Receptor. *J Chem Theory Comput*, 11, 4439-49.
- SANTESSON, C. G. 1928. Ein Pfeilgift mit Herzwirkung aus der Neuen Welt. *Pharmakologische Abteilung des Karolinischen medico-chirurgischen Instituts, Stockholm, Schweden*, 230-257.
- SAROLI, A. 1984. Structure-activity relationship of a bitter compound: denatonium chloride. *Naturwissenschaften*, 71, 428-9.
- SCHIFFMAN S.S. & .CA., G. 1993. Sweeteners: state of knowledge review. *Neurosci Biobehav Rev*, 17, 313-345.
- SCHIFFMAN S.S., BOOTH B.J., LOSEE M.L., PECORE S.D. & Z.S., W. 1995. Bitterness of sweeteners as a function of concentration. *Brain Res Bull*, 36, 505-513.
- SHAH, A. S., BEN-SHAHAR, Y., MONINGER, T. O., KLINE, J. N. & WELSH, M. J. 2009. Motile cilia of human airway epithelia are chemosensory. *Science*, 325, 1131-4.
- SHET, N. & VAIDYA, I. 2013. Taste Masking: A Pathfinder for Bitter Drugs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18, 1-12.
- SINGH, N., VRONTAKIS, M., PARKINSON, F. & CHELIKANI, P. 2011. Functional bitter taste receptors are expressed in brain cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 406, 146-51.

- SLACK, J. P., BROCKHOFF, A., BATRAM, C., MENZEL, S., SONNABEND, C., BORN, S., GALINDO, M. M., KOHL, S., THALMANN, S., OSTOPOVICI-HALIP, L., SIMONS, C. T., UNGUREANU, I., DUINEVELD, K., BOLOGA, C. G., BEHRENS, M., FURRER, S., OPREA, T. I. & MEYERHOF, W. 2010. Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol*, 20, 1104-9.
- SOHI, H., SULTANA, Y. & KHAR, R. K. 2004. Taste masking technologies in oral pharmaceuticals: recent developments and approaches. *Drug Dev Ind Pharm*, 30, 429-48.
- SORANZO, N., BUFE, B., SABETI, P. C., WILSON, J. F., WEALE, M. E., MARGUERIE, R., MEYERHOF, W. & GOLDSTEIN, D. B. 2005. Positive selection on a high-sensitivity allele of the human bitter-taste receptor TAS2R16. *Curr Biol*, 15, 1257-65.
- SUESS, B., BROCKHOFF, A., MEYERHOF, W. & HOFMANN, T. 2016. The Odorant (R)-Citronellal Attenuates Caffeine Bitterness by Inhibiting the Bitter Receptors TAS2R43 and TAS2R46. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- SYED, A. S. & KORSCHING, S. I. 2014. Positive Darwinian selection in the singularly large taste receptor gene family of an 'ancient' fish, *Latimeria chalumnae*. *BMC Genomics*, 15, 650.
- SZENTE, L. & SZEJTLI, J. 2004. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 137-142.
- TEPPER, B. J. 1998. 6-n-Propylthiouracil: a genetic marker for taste, with implications for food preference and dietary habits. *Am J Hum Genet*, 63, 1271-6.
- THALMANN, S., BEHRENS, M. & MEYERHOF, W. 2013. Major haplotypes of the human bitter taste receptor TAS2R41 encode functional receptors for chloramphenicol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435, 267-273.
- TOMCHIK, S. M., BERG, S., KIM, J. W., CHAUDHARI, N. & ROPER, S. D. 2007. Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *J Neurosci*, 27, 10840-8.
- TRAVERS, J. B. 1988. Efferent projections from the anterior nucleus of the solitary tract of the hamster. *Brain Res*, 457, 1-11.
- TYNDALL, J. D. & SANDILYA, R. 2005. GPCR agonists and antagonists in the clinic. *Med Chem*, 1, 405-21.
- UEDA, T., UGAWA, S., YAMAMURA, H., IMAIZUMI, Y. & SHIMADA, S. 2003. Functional interaction between T2R taste receptors and G-protein alpha subunits expressed in taste receptor cells. *J Neurosci*, 23, 7376-80.

- VANDENBEUCH, A., CLAPP, T. R. & KINNAMON, S. C. 2008. Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci*, 9, 1.
- VERBEKE, W. 2006. Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference*, 17, 126-131.
- VETTER, J. 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38, 11-36.
- VINCENT, H. C., LYNCH, M. J., POHLEY, F. M., HELGREN, F. J. & KIRCHMEYER, F. J. 1955. A taste panel study of cyclamate-saccharin mixture and of its components. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*, 44, 442-6.
- WAGNER, A. E., BOESCH-SAADATMANDI, C., DOSE, J., SCHULTHEISS, G. & RIMBACH, G. 2012. Anti-inflammatory potential of allyl-isothiocyanate – role of Nrf2, NF- κ B and microRNA-155 *Cellular and Molecular Medicine*, 16, 836-843.
- WHO 2014. Global status report on noncommunicable diseases 2014. *World Health Organization (WHO)*.
- WIENER, A., SHUDLER, M., LEVIT, A. & NIV, M. Y. 2011. BitterDB: a database of bitter compounds. *Nucleic Acids Res*, 40, D413-9.
- WOODING, S., KIM, U. K., BAMSHAD, M. J., LARSEN, J., JORDE, L. B. & DRAYNA, D. 2004. Natural selection and molecular evolution in PTC, a bitter-taste receptor gene. *Am J Hum Genet*, 74, 637-46.
- ZAGROBELNY, M., BAK, S., RASMUSSEN, A. V., JØRGENSEN, B., NAUMANN, C. M. & MØLLER, B. L. 2004. Cyanogenic glucosides and plant–insect interactions. *Phytochemistry*, 65, 293-306.
- ZHANG, Y. 2010. Allyl isothiocyanate as a cancer chemopreventive phytochemical. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 127–135.

8. Bildquellenverzeichnis

- AMANO, S., MIYADOH, S., SHOMURA, T. *Streptomyces griseus* M-1027. Digital Atlas of Actinomycetes 2. The Society of Actinomycetes Japan.
URL: <http://www.actino.jp/DigitalAtlas/atlas.cgi?section=8> Stand: 28. Juni 2018.
- HUFFMANN. Adult males Jiluba chewing on the pith of "mjonso" *Vernonia amygdalina* while heavily infected with strongyle nematode *Oesophogostomun stephanostomun*. URL: https://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/social_systems_evolution/huffman/CHIPP.html
Stand: 29. Juni 2018.
- NEUWINGER, H.D. 1998. Jagdpfeil. In: Afrikanische Arzneipflanzen und Jagdgifte. 2. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Seite 87.
- RÄTSCH, C. 1990. Rinde des Yohimbe-Baums. In: Pflanzen der Liebe – Aphrodisiaka in Mythos, Geschichte und Gegenwart. Hallwag Verlag Bern, Stuttgart, Seite 54.
- PIXABAY. Moskito.
URL: <https://pixabay.com/de/moskito-bei%C3%9Fen-weiblich-parasit-542156/>
Stand: 5. Juli 2018.
- PIXABAY. Nylon. URL: <https://pixabay.com/de/hintergrund-spule-farbe-bunte-2182/>
Stand: 6. Juli 2018.
- SITTE, P., WEILER, E.W., KADEREIT, BRESINSKY, A., KÖRNER, C. 2002. *Strychnos nux-vomica*. In: Strasburger – Lehrbuch der Botanik. 35. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Seite 848.
- WIECHOCZEK, D., BLUME, R. Bild 3: Ammoniumchlorid vor und nach der Elektrolyse.
URL: http://www.chemieunterricht.de/dc2/tip/09_99.htm Stand: 6. Juli 2018.

9. Anhang

9.1 Antagonisten aus der Substanzbibliothek

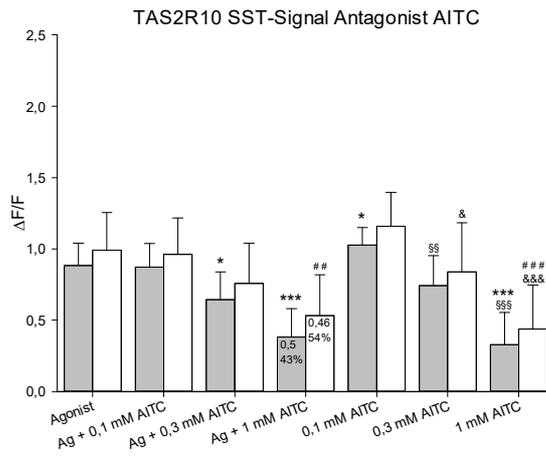
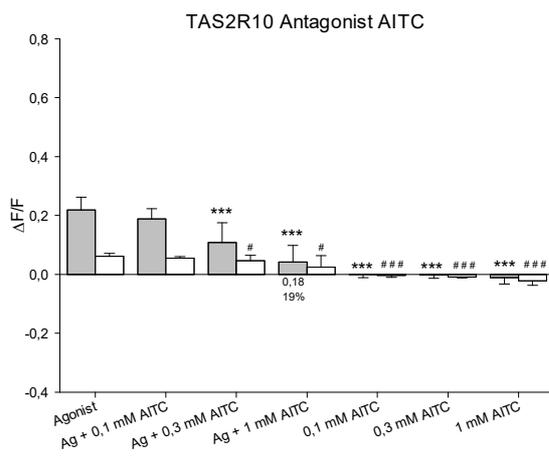
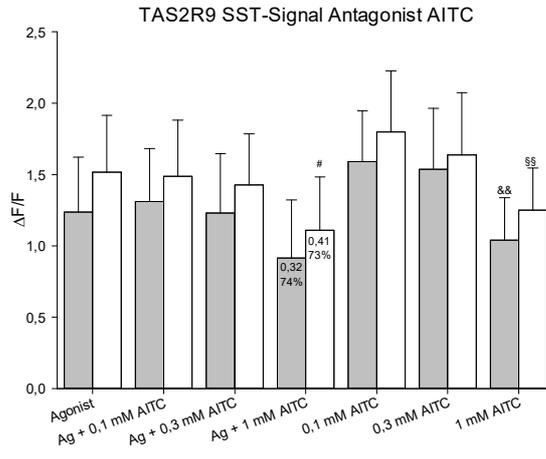
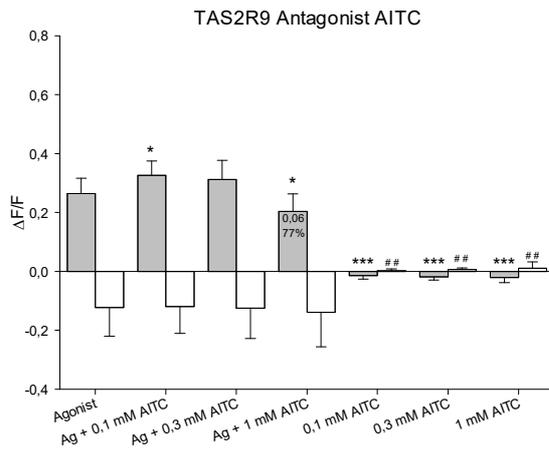
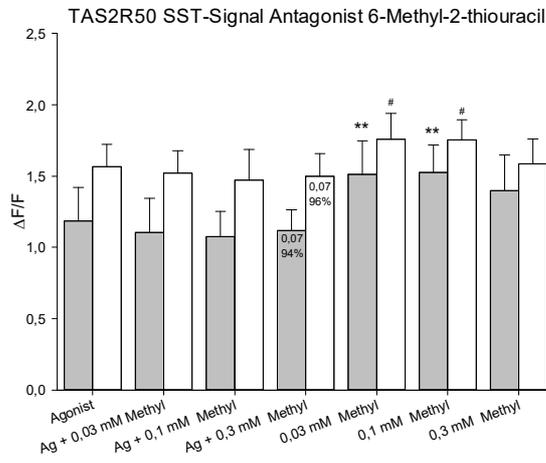
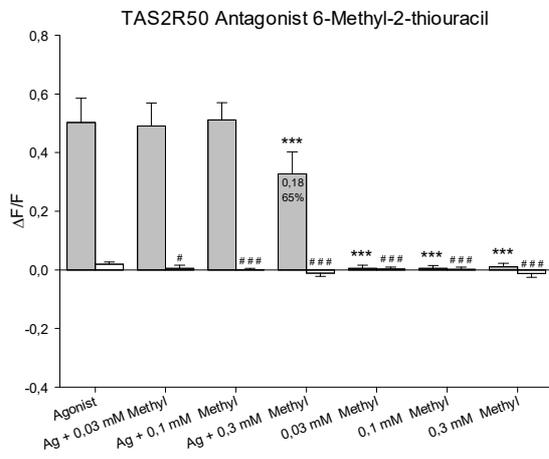
Im Folgenden ist die Auswertung der Experimente mit allen durchgeführten Kontrollen gezeigt, welche in Abschnitt 3.1.1 bis 3.1.7 in Auszügen gezeigt sind. Alle in Tabelle 8 (Seite 51) verzeichneten Antagonisten wurden in drei Konzentrationen jeweils mit und ohne Agonist auf die TAS2R-exprimierenden Zellen und die Leervektor-transfizierten Zellen appliziert (Erstapplikation). Auch die Calciumspuren der Somatostatin 14 Applikation (SST) (Zweitapplikation) wurden ausgewertet. Auf der linken Seite ist die Auswertung der Fluoreszenzsignale der Erstapplikation der TAS2R-exprimierenden Zellen (grau) und der Leervektor-transfizierten Zellen (weiß) zu sehen, welche durch die Zugabe des Agonisten (Ag), des Inhibitors und deren Kombination miteinander hervorgerufen wurden, $n = 3$, Messwerte \pm Standardabweichung.

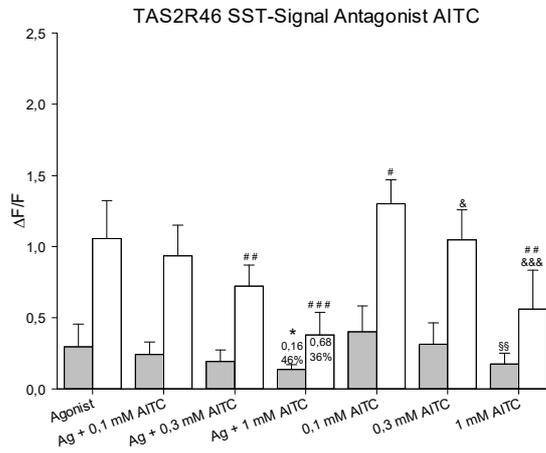
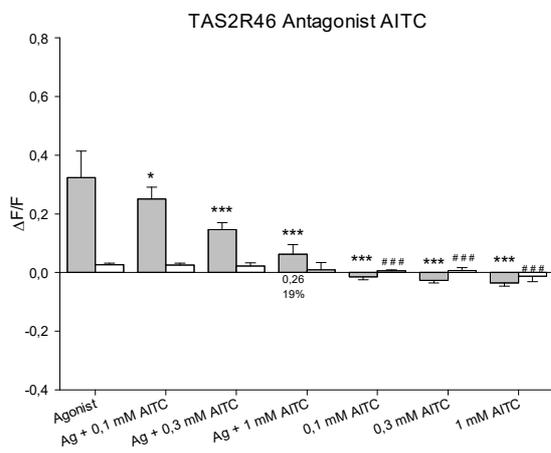
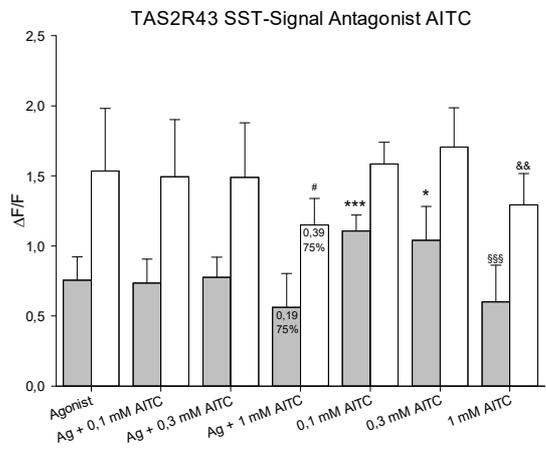
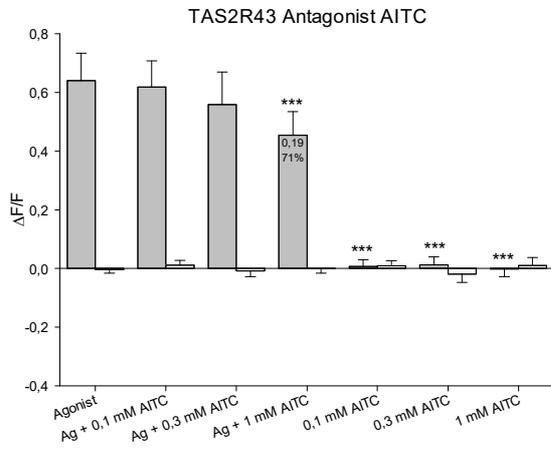
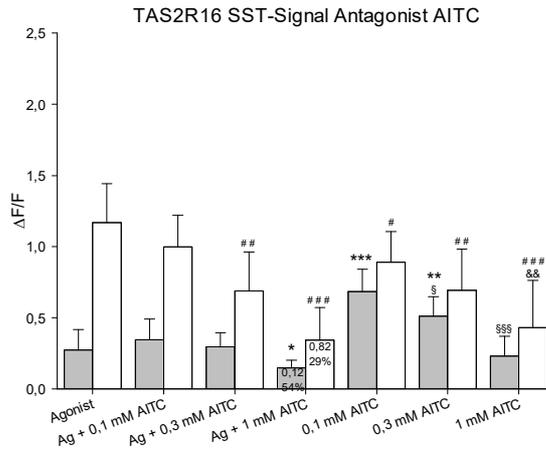
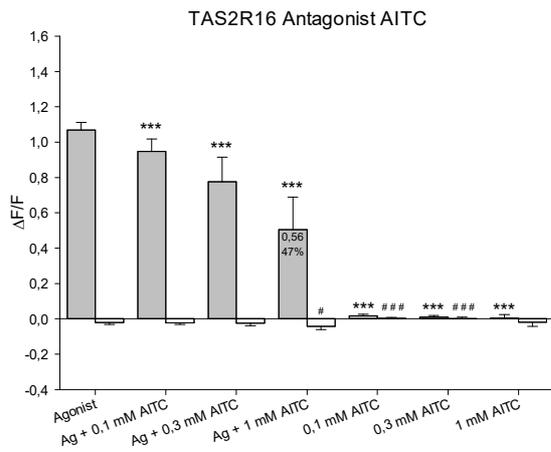
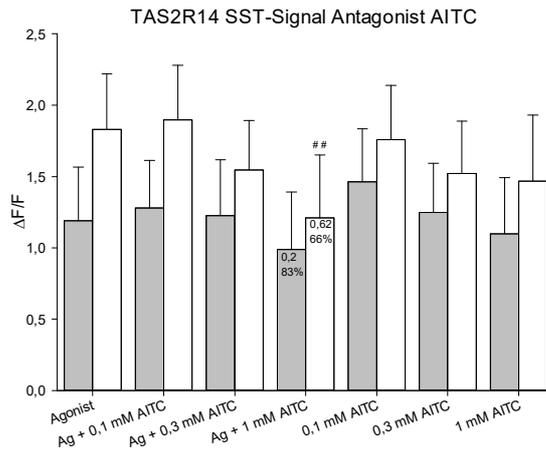
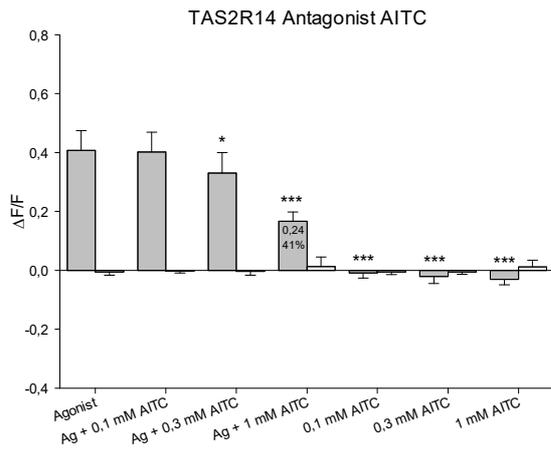
Nach der Zugabe der Testsubstanzen erfolgte die Applikation von Somatostatin 14 (SST). Die Graphen auf der rechten Seite zeigen die relativen Fluoreszenzsignale dieser Zweitapplikation der TAS2R-exprimierenden Zellen (grau) und der Leervektor-transfizierten Zellen (weiß), welche durch die Zugabe von SST hervorgerufen wurden, $n = 3$, Messwerte \pm Standardabweichung.

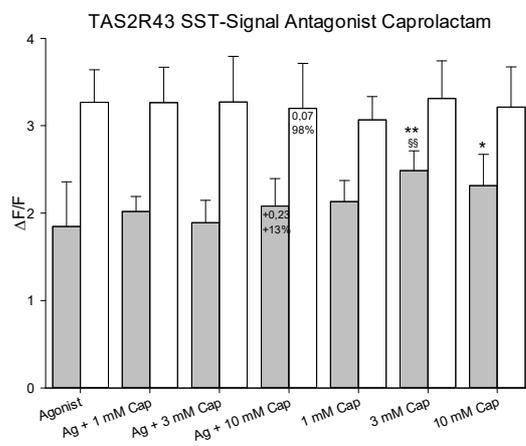
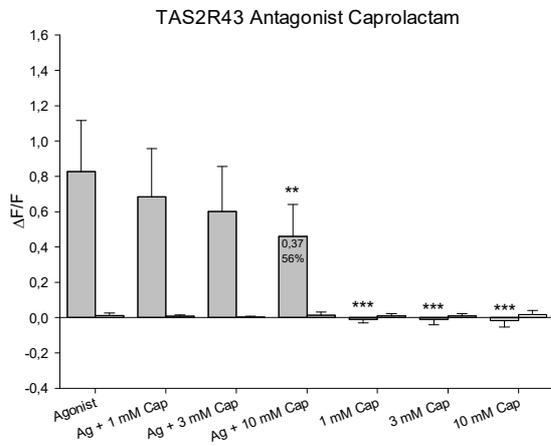
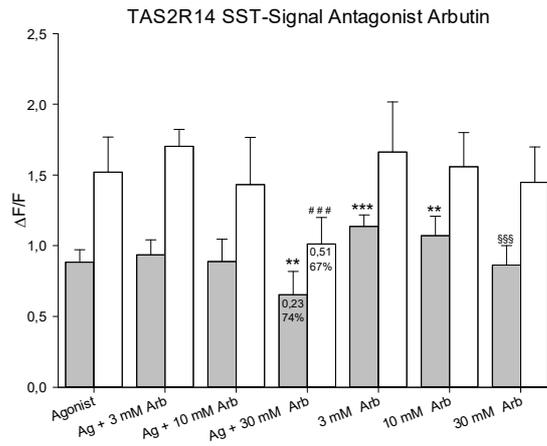
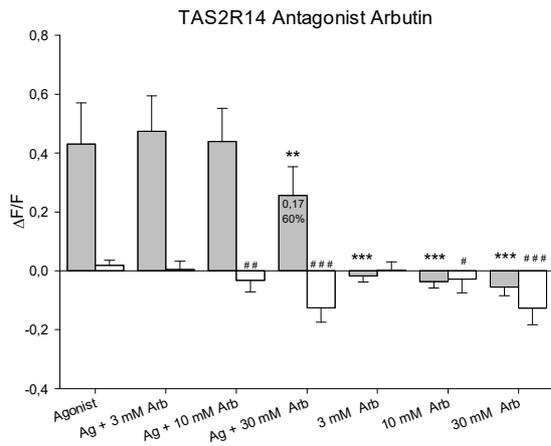
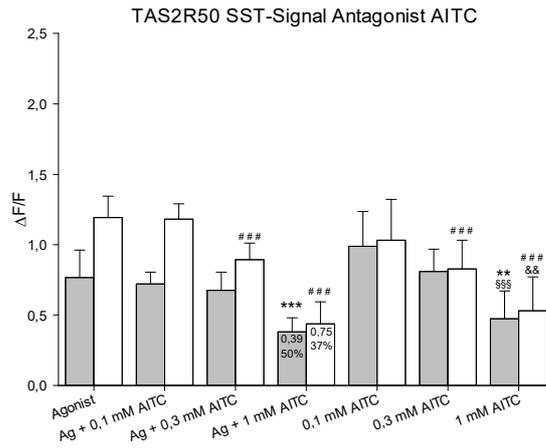
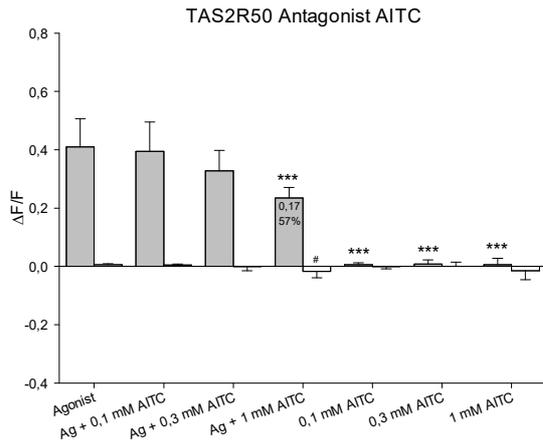
Für die Antagonisten-Rezeptor-Paare für die die Reduktion des Agonisten-induzierten Rezeptorsignals nicht signifikant war, sind zusätzlich die Einzelexperimente (Exp 1 bis 3) gezeigt (Agonist allein appliziert und simultane Applikation des Agonisten und des Antagonisten in drei Konzentrationen auf den TAS2R-exprimierenden Zellen).

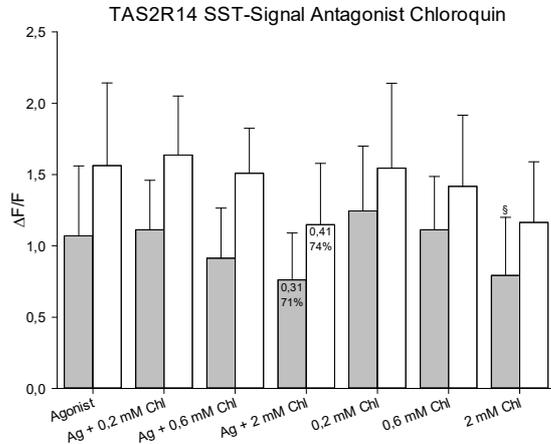
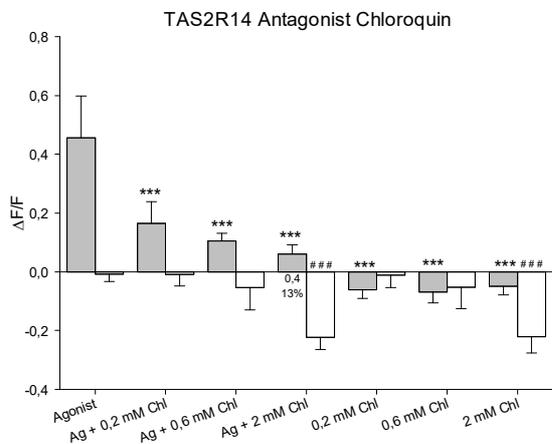
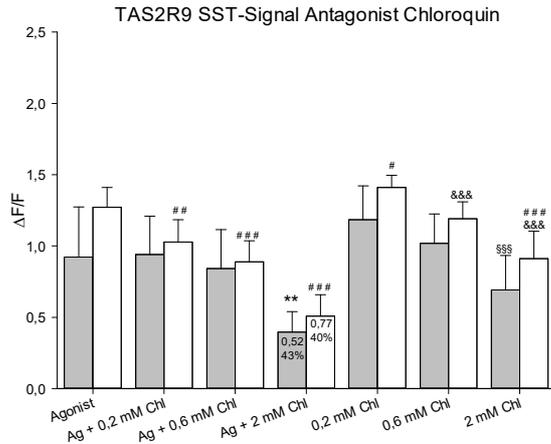
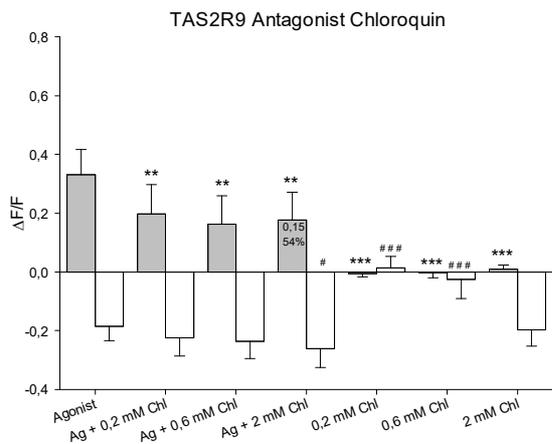
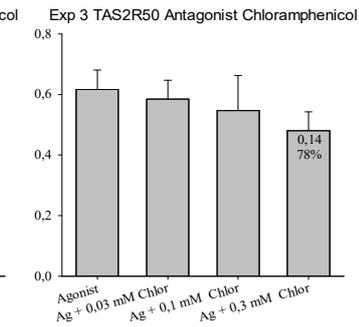
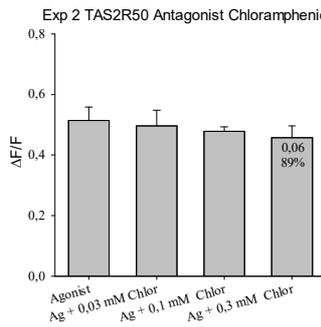
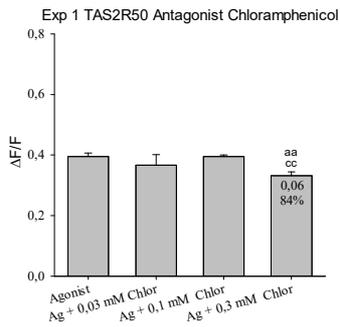
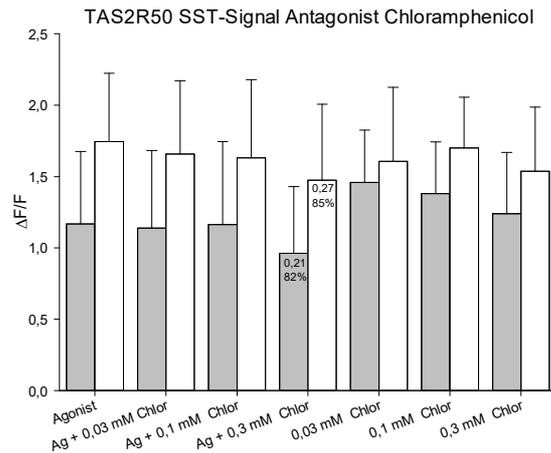
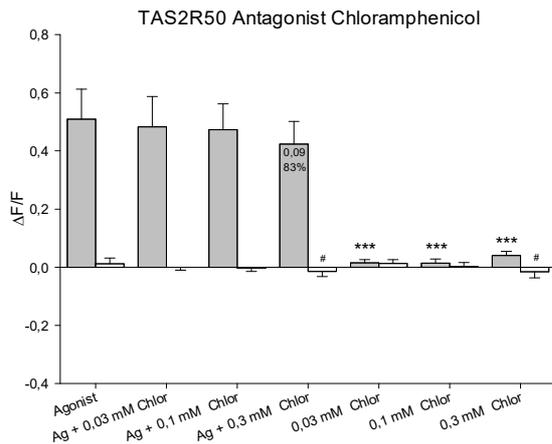
Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt. Dabei wurden jeweils die residualen Fluoreszenzwerte der TAS2R-transfizierten Zellen (*) bei alleiniger Applikation des Agonisten mit den Signalen der TAS2R-transfizierten Zellen bei simultaner Applikation von Agonist und Inhibitor, und bei alleiniger Applikation des Inhibitors miteinander verglichen. Gleiches gilt für die Leervektor-transfizierten Zellen (#). Des Weiteren wurden die SST-Signale der TAS2R-transfizierten Zellen bei der Applikation der niedrigsten Konzentration des Inhibitors mit den höheren Konzentrationen des Inhibitors auf statistische Signifikanz getestet (§). Dies wurde auch für die Leervektor-transfizierten Zellen durchgeführt (&). Für die Einzelexperimente wurden alle Wirkstoff-Kombinationen miteinander verglichen (a: signifikant zur alleinigen Applikation des Agonisten, b: signifikant zum Gemisch Agonist und Antagonist in niedrigster Konzentration, c: signifikant zum Gemisch Agonist und Antagonist in mittlerer Konzentration). Dabei gilt $p \leq 0,05$ 1 Zeichen; $p \leq 0,01$ 2 Zeichen; $p \leq 0,001$ 3 Zeichen.

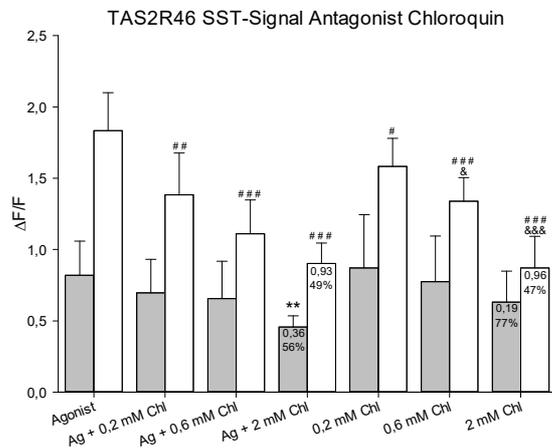
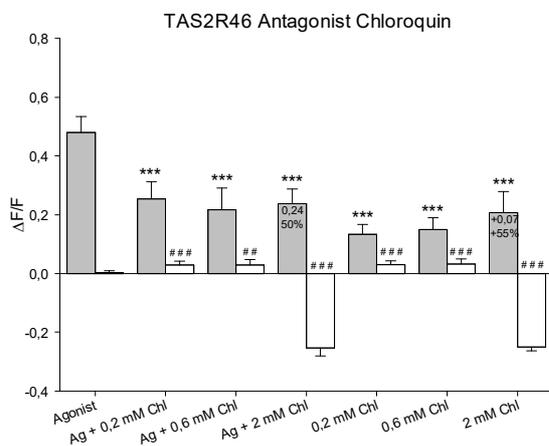
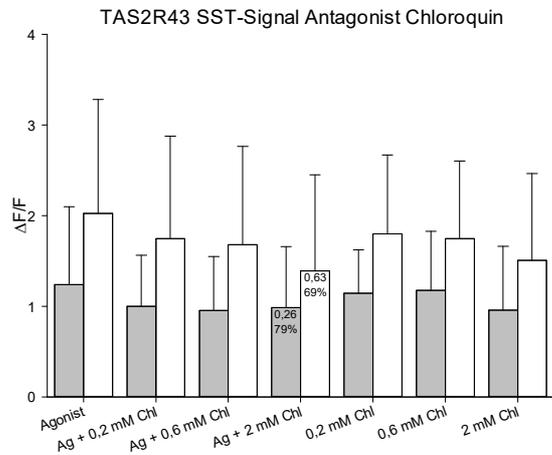
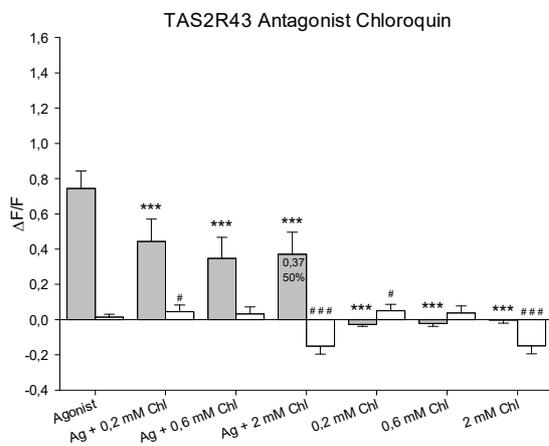
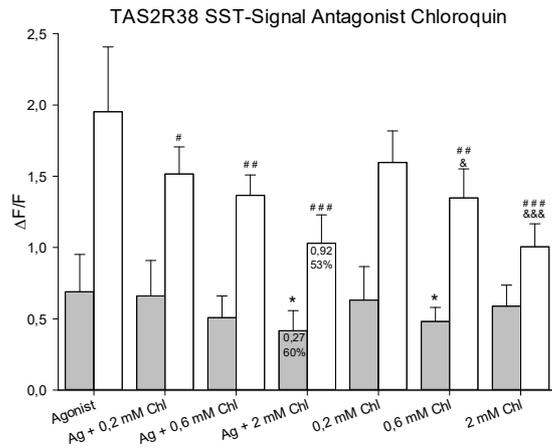
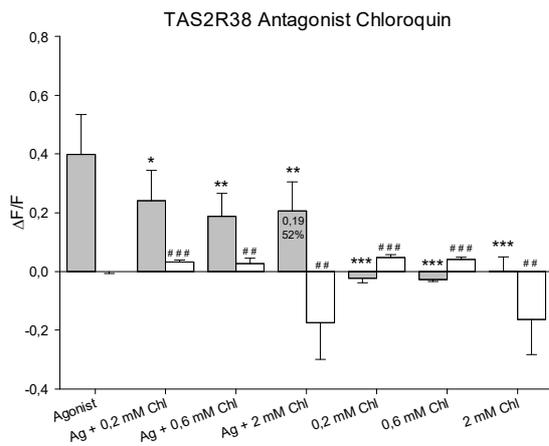
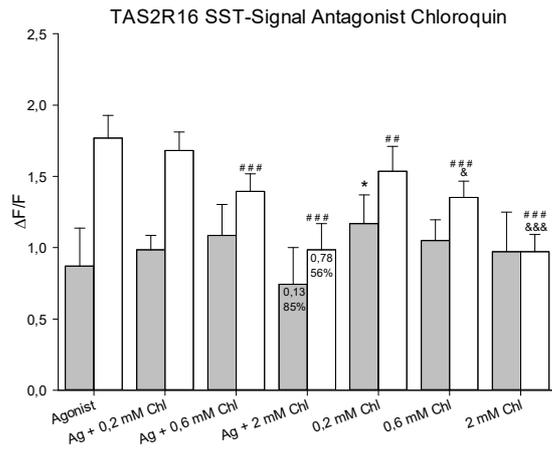
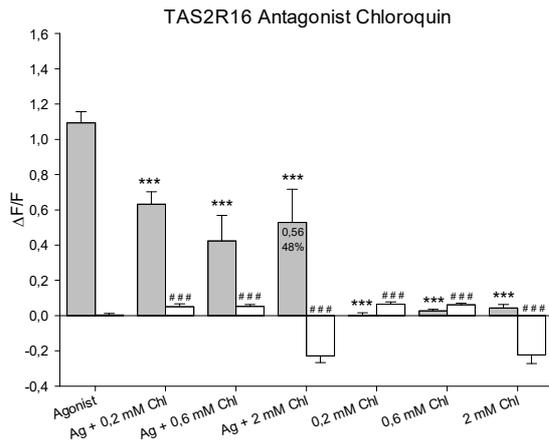
In den Graphen angegeben ist die Abnahme der relativen Fluoreszenzwerte der TAS2R- bzw. der Leervektor-transfizierten Zellen zwischen der alleinigen Applikation des Agonisten und der simultanen Zugabe des Agonisten und der höchsten Konzentration des Antagonisten (oben die Reduktion um $x \Delta F/F$, unten die Reduktion auf $x \%$).

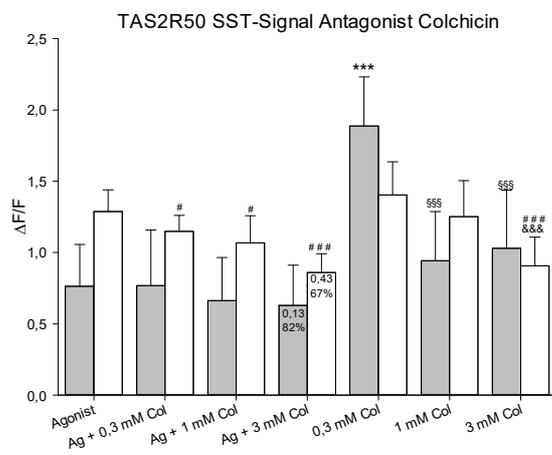
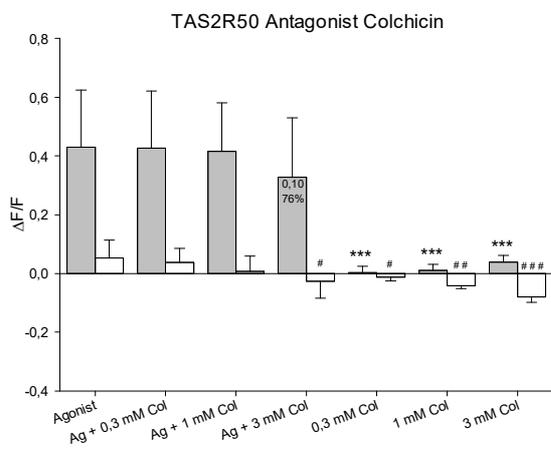
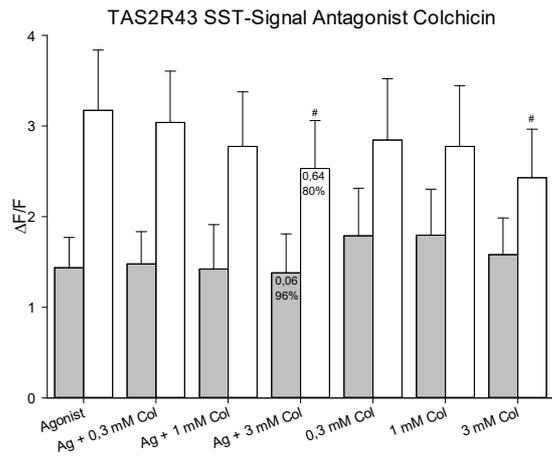
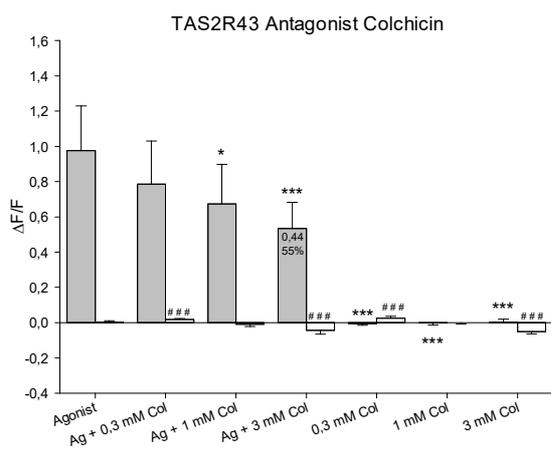
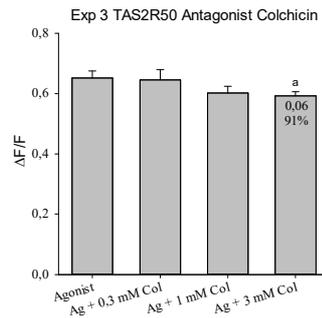
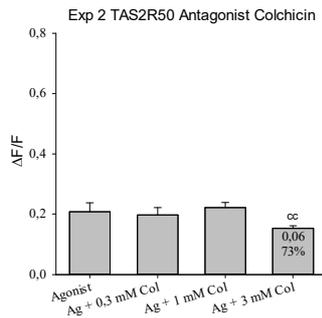
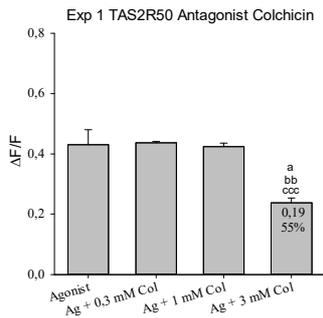
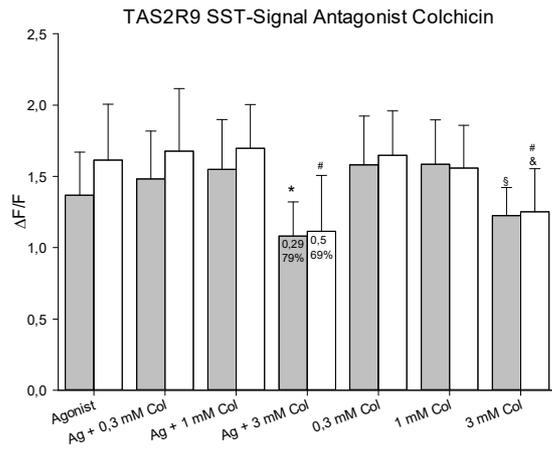
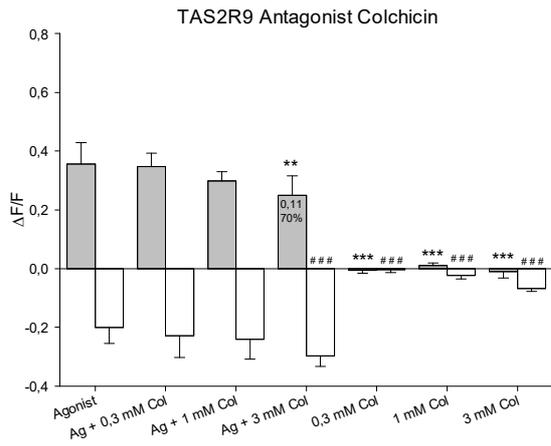


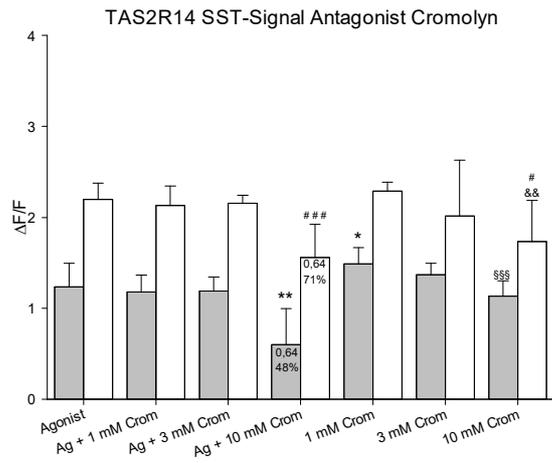
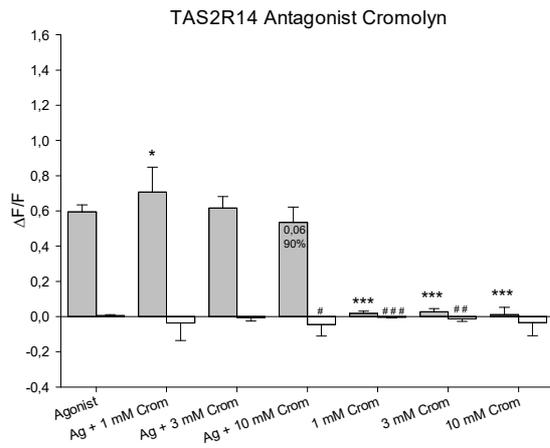
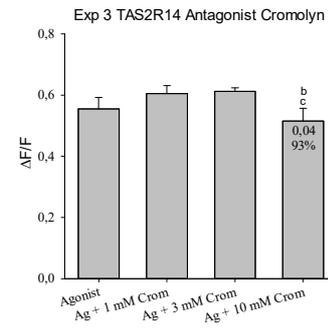
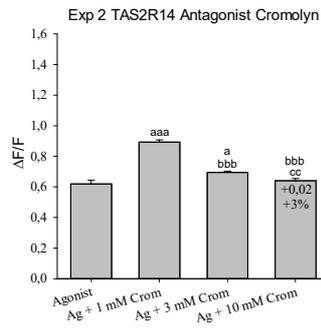
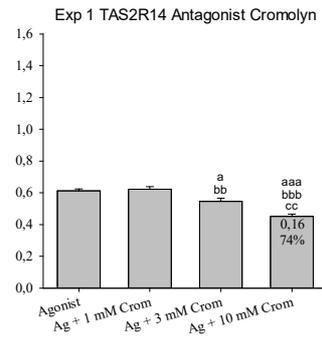
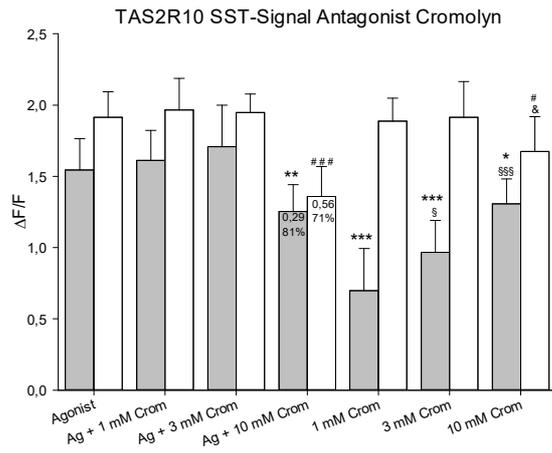
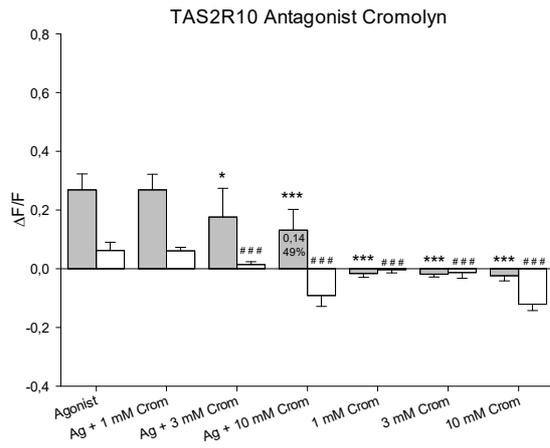


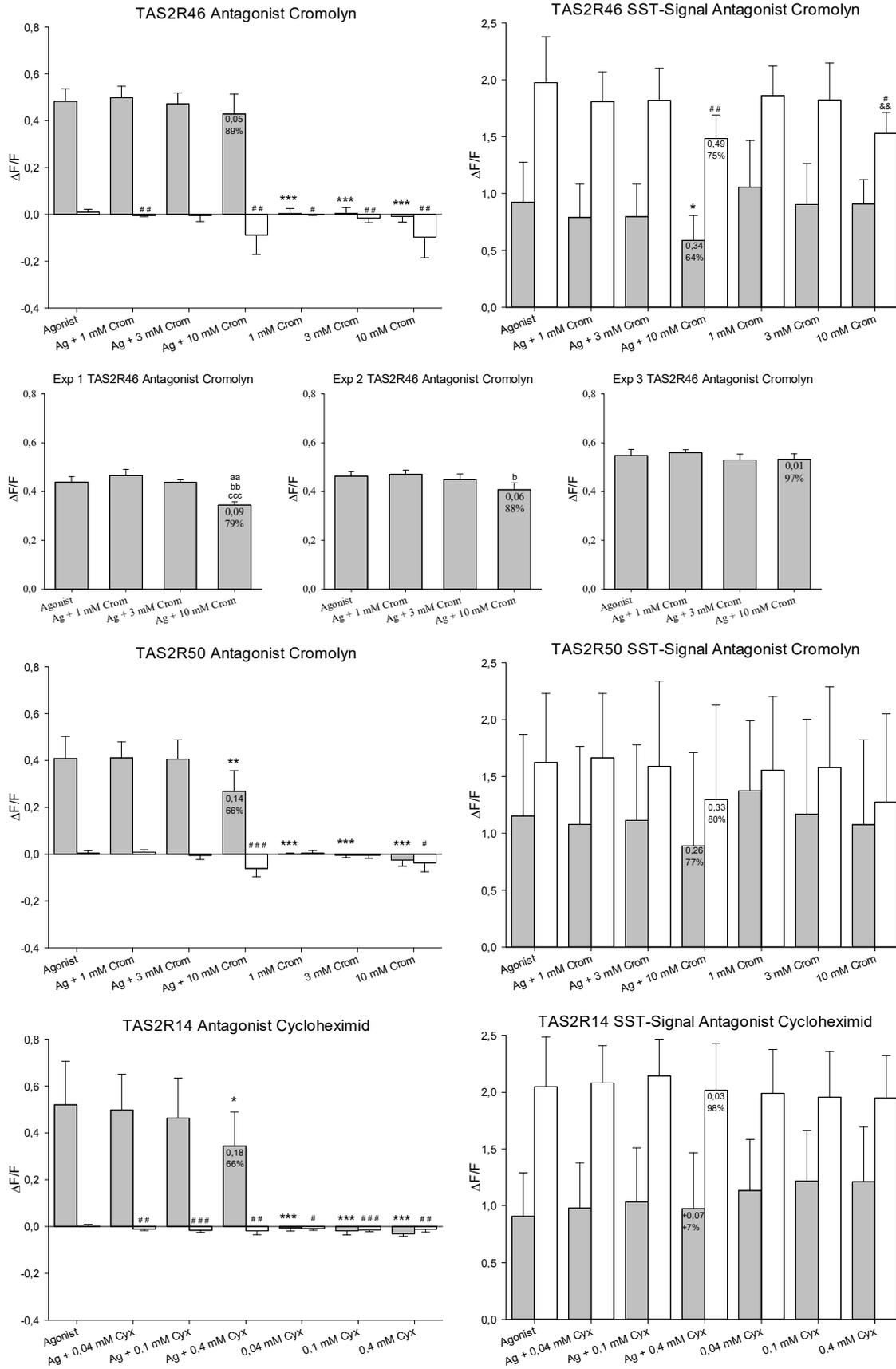


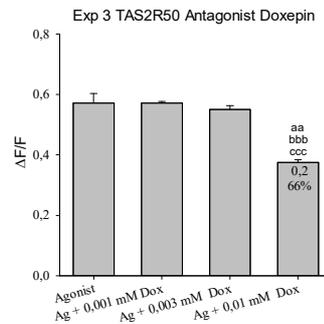
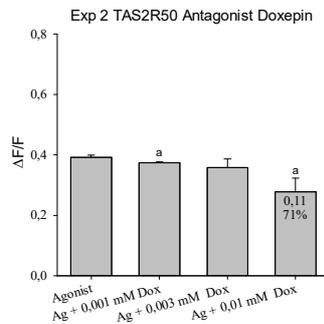
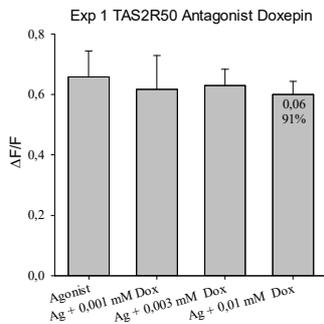
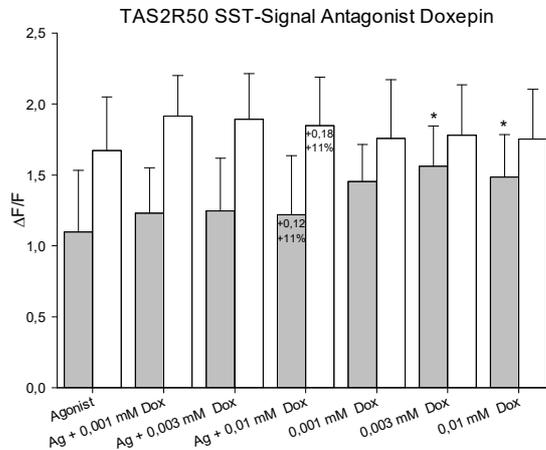
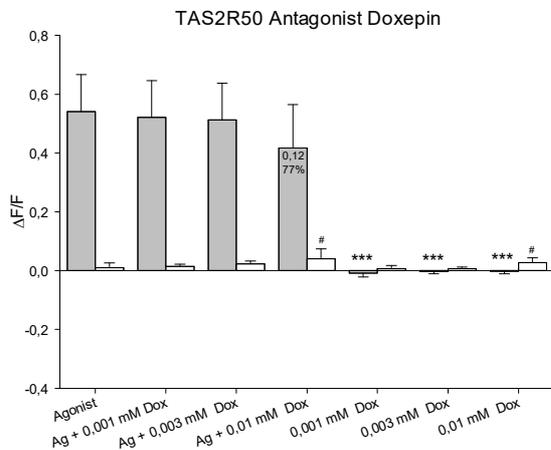
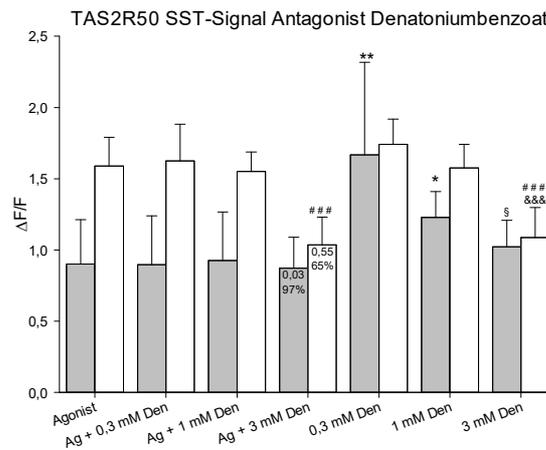
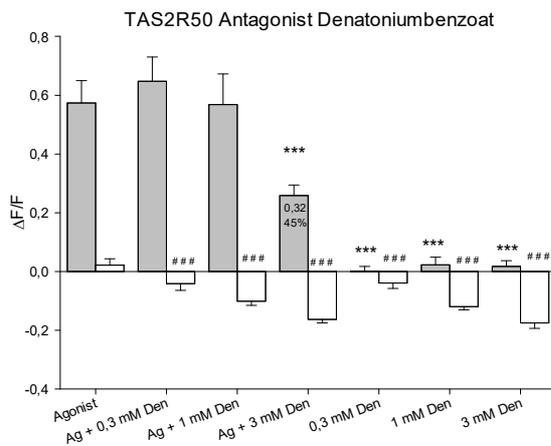
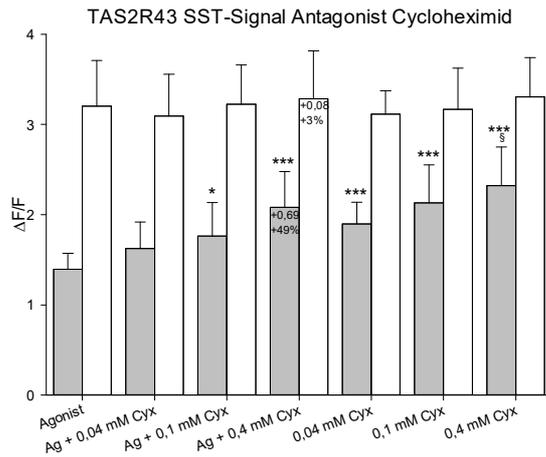
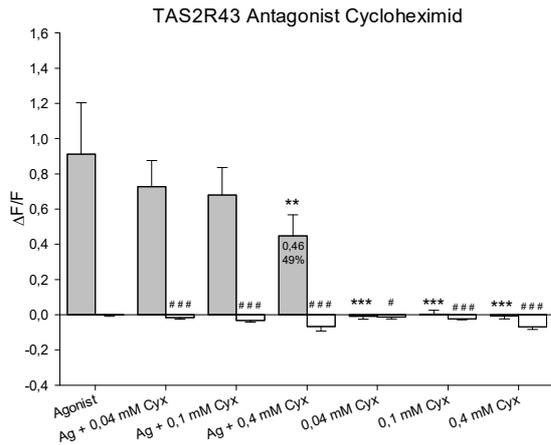


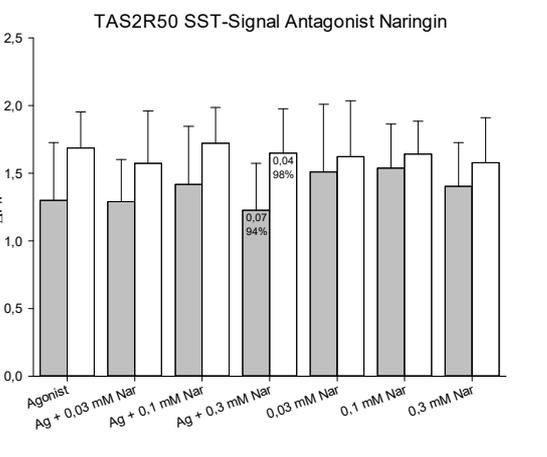
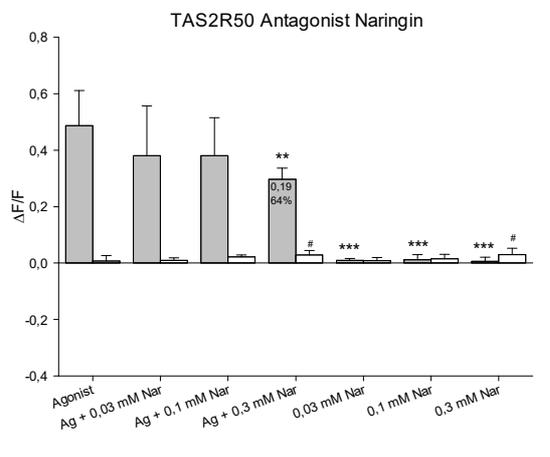
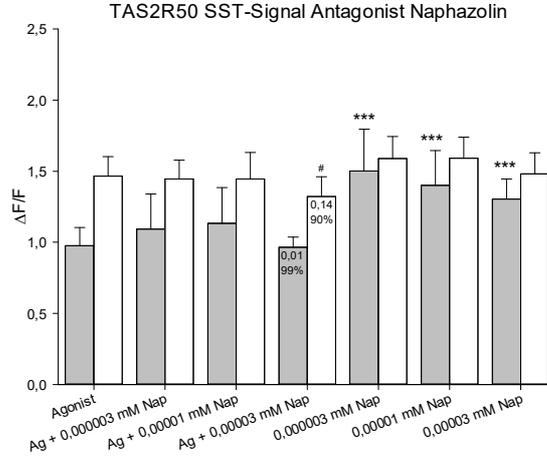
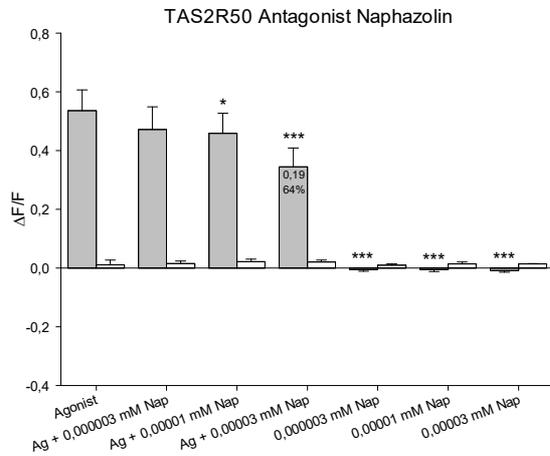
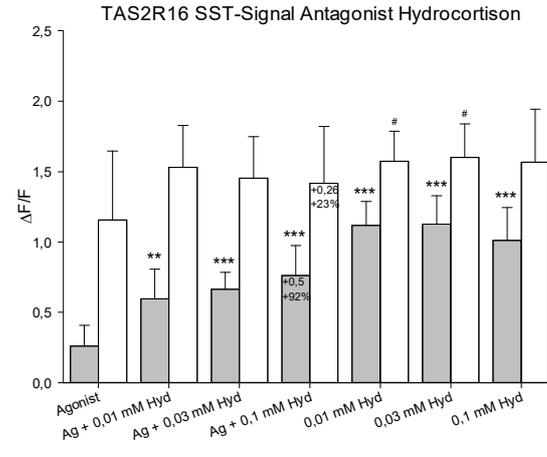
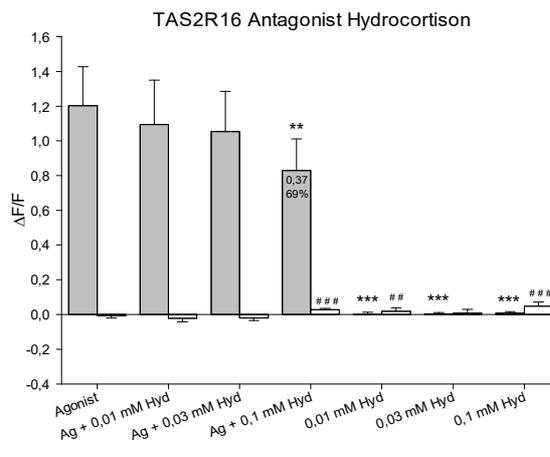
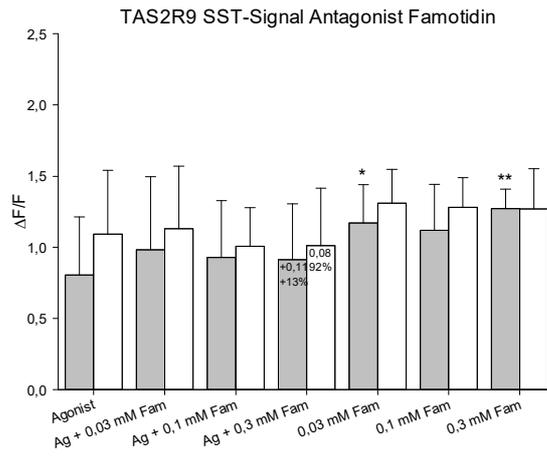
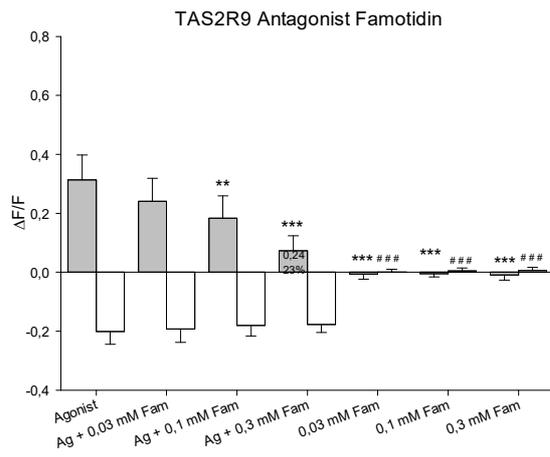


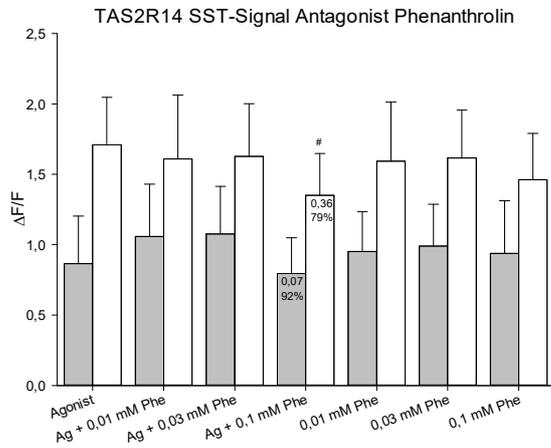
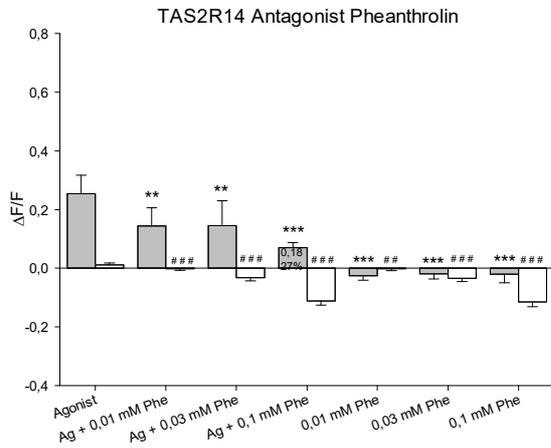
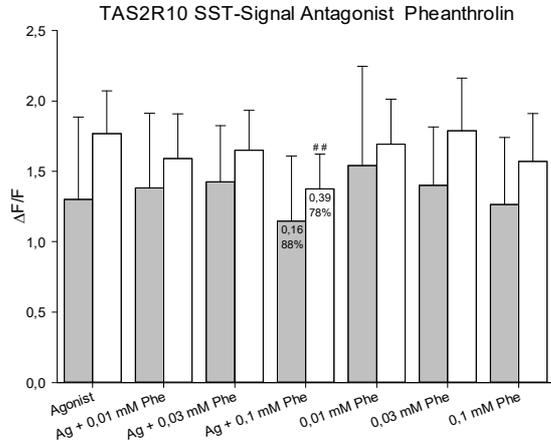
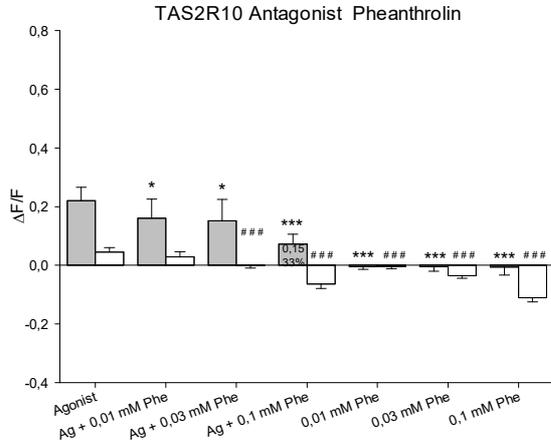
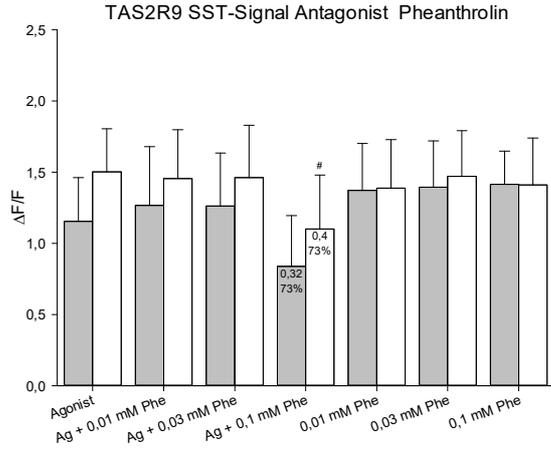
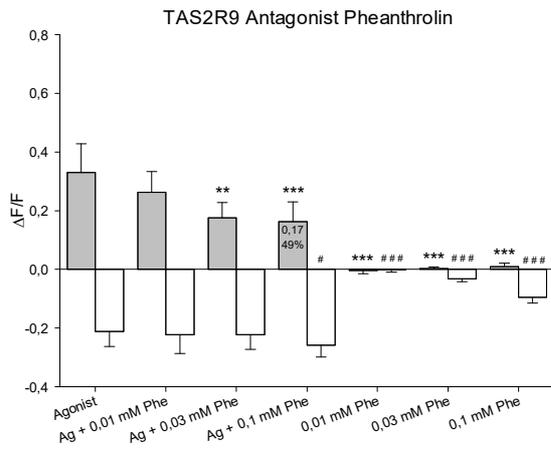
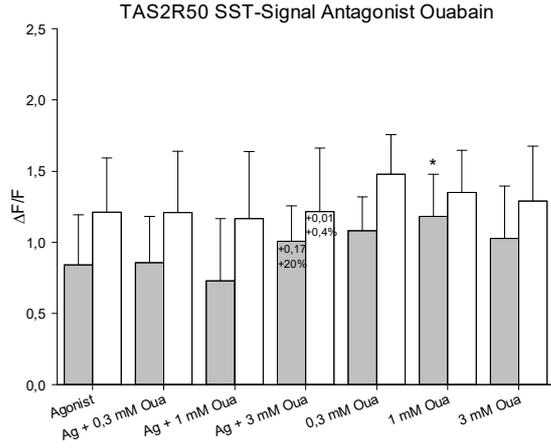
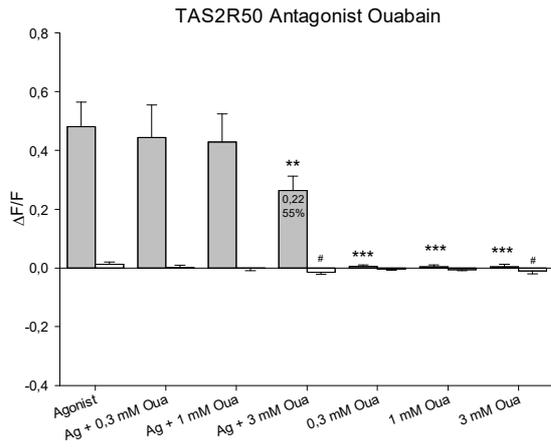


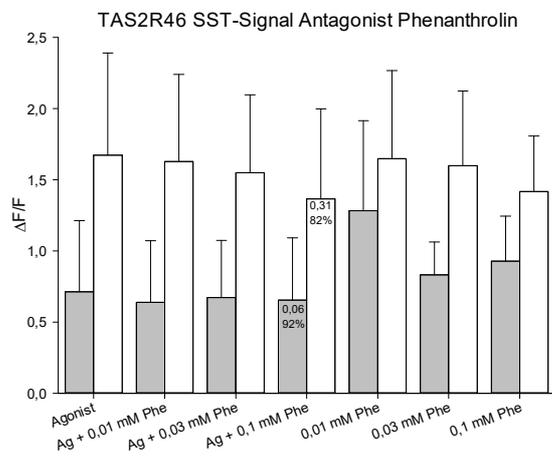
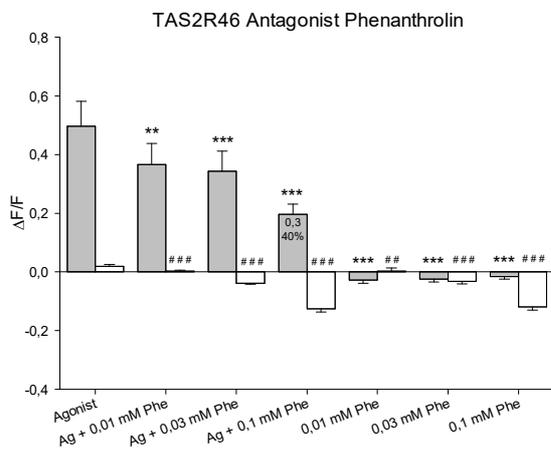
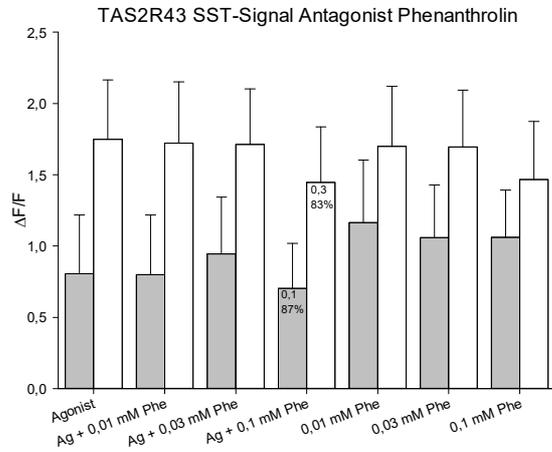
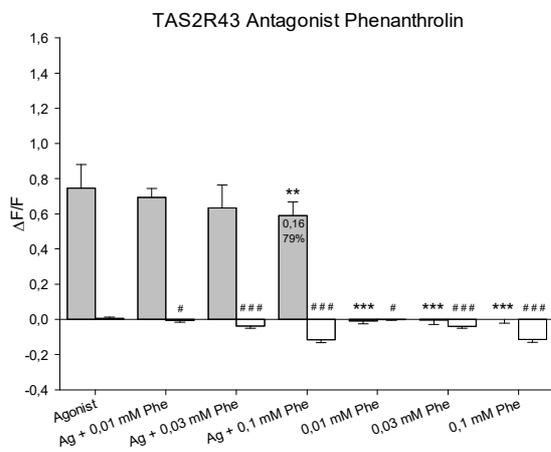
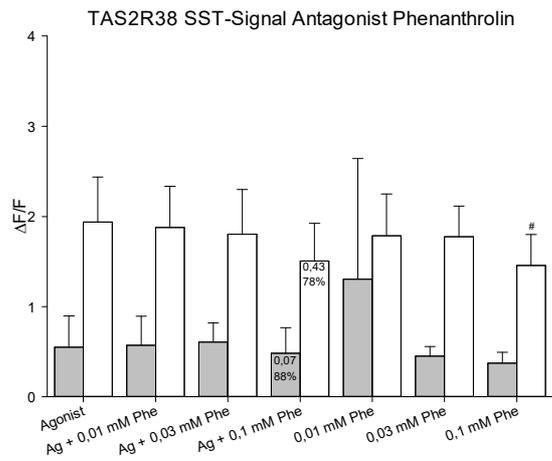
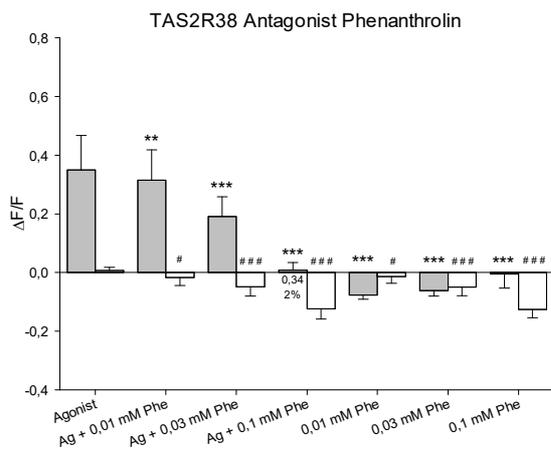
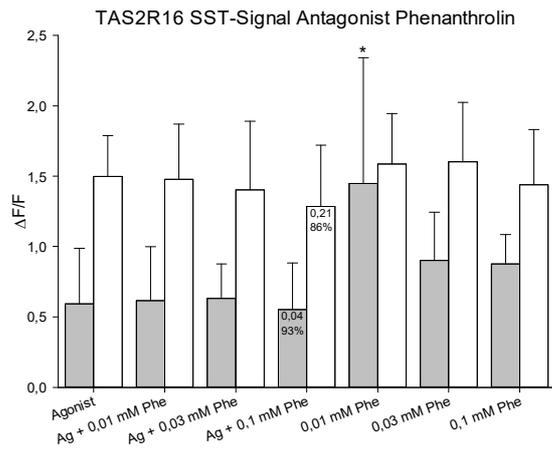
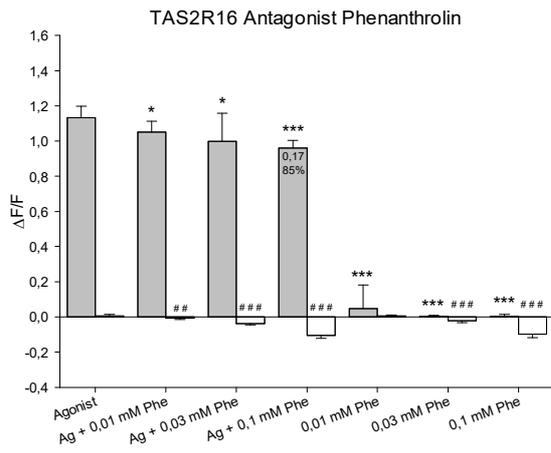


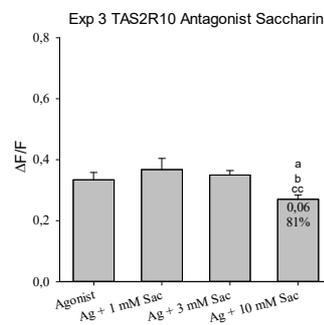
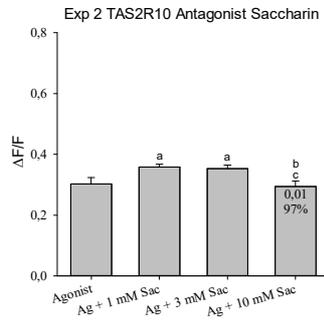
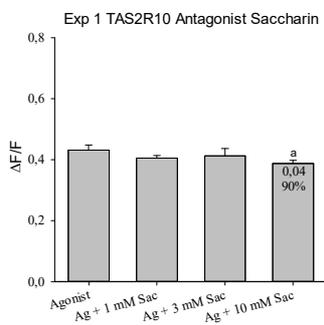
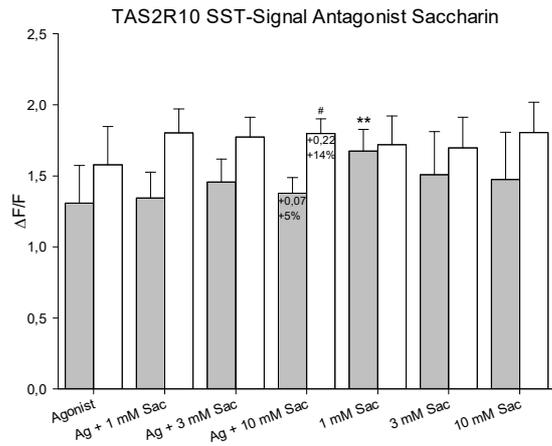
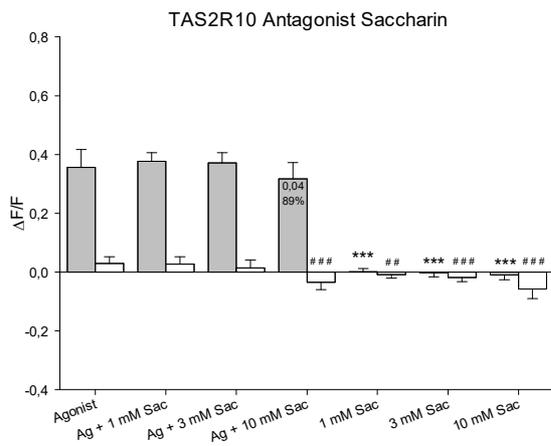
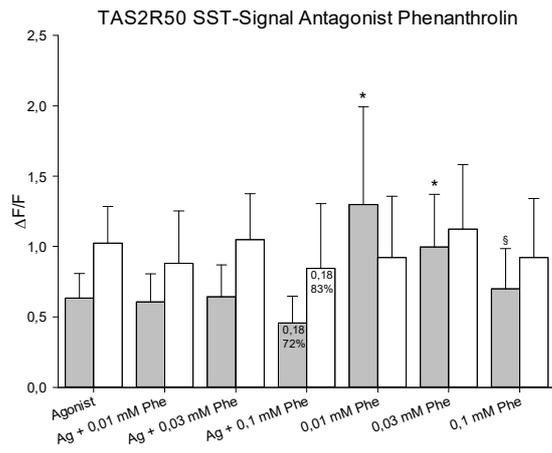
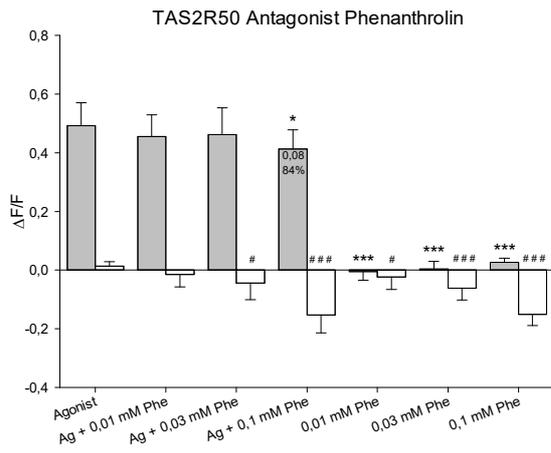


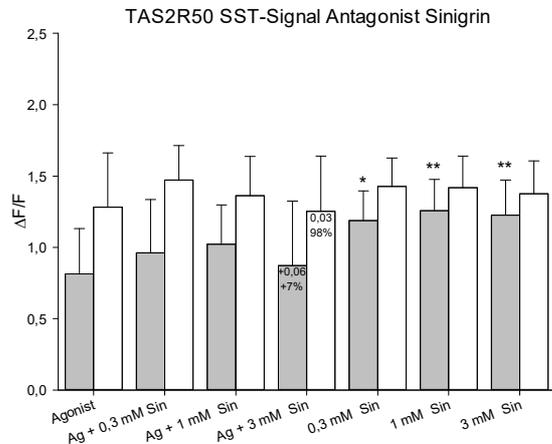
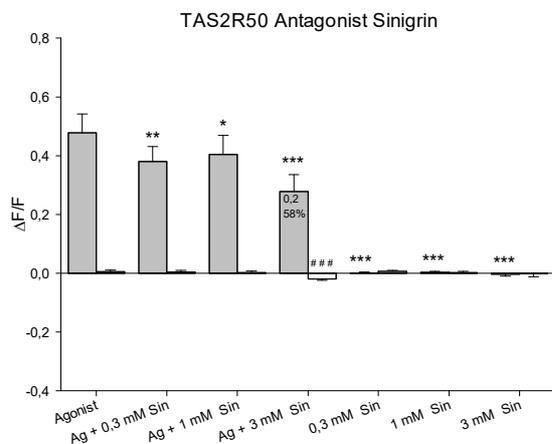
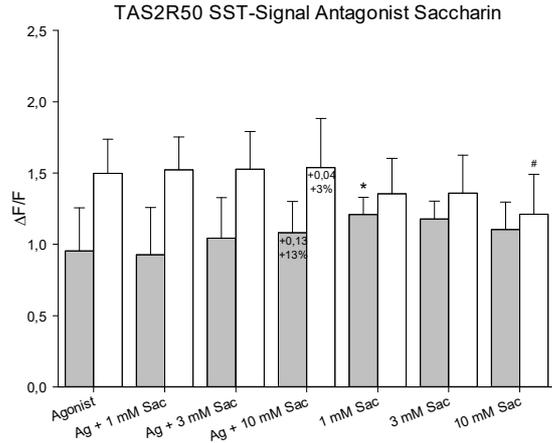
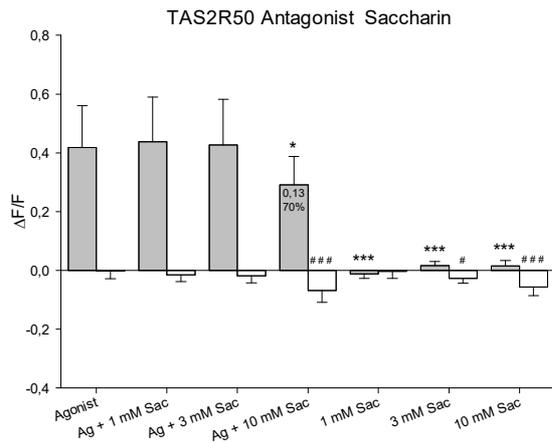
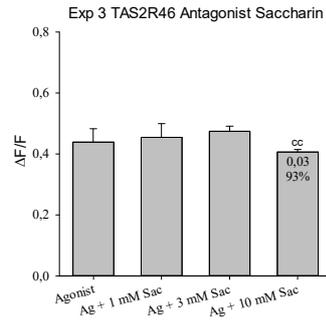
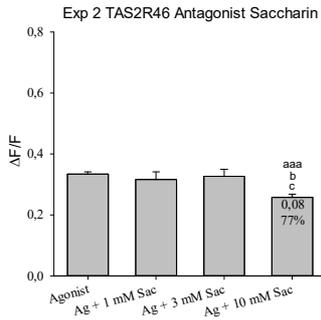
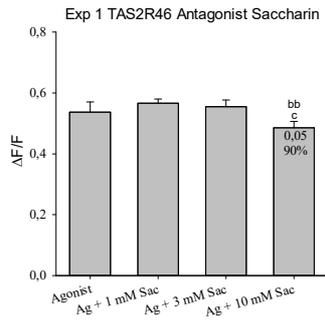
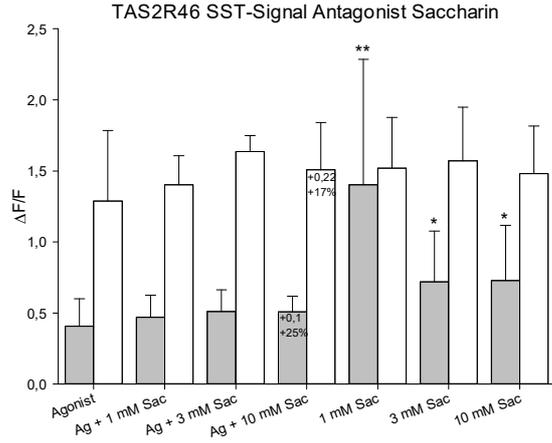
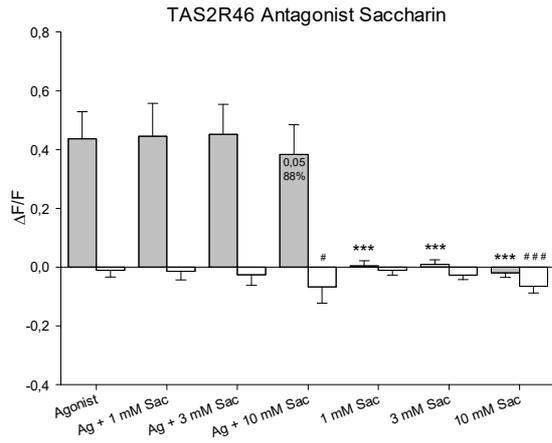


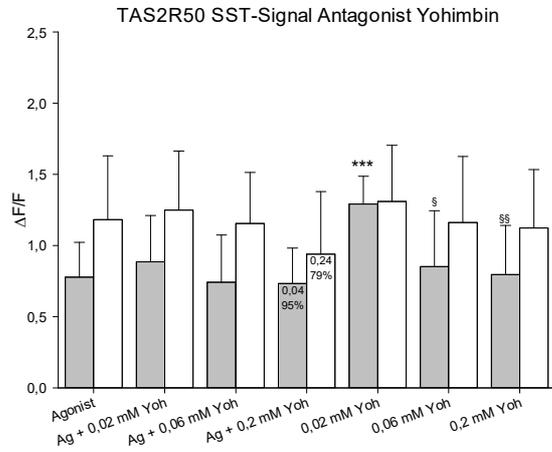
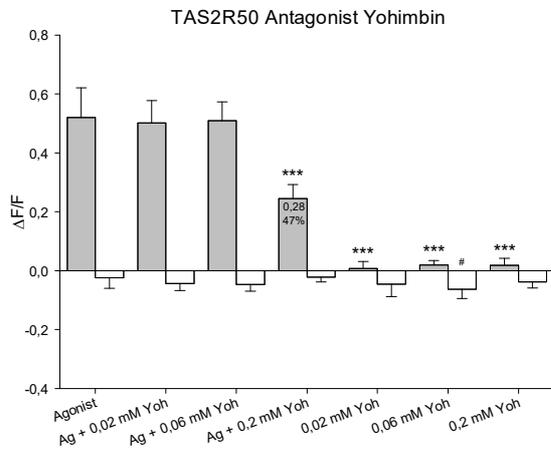
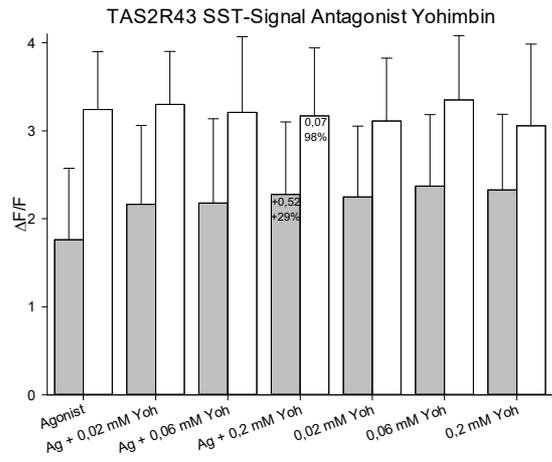
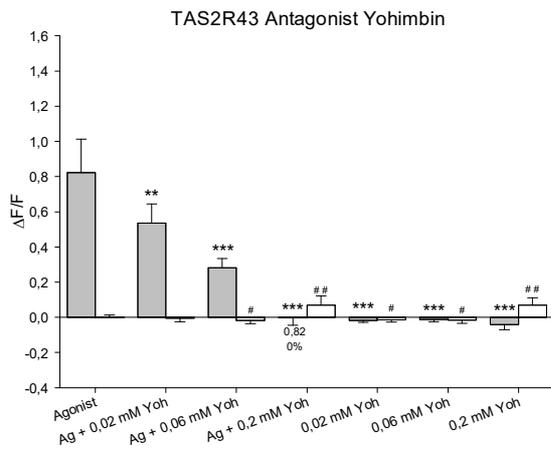
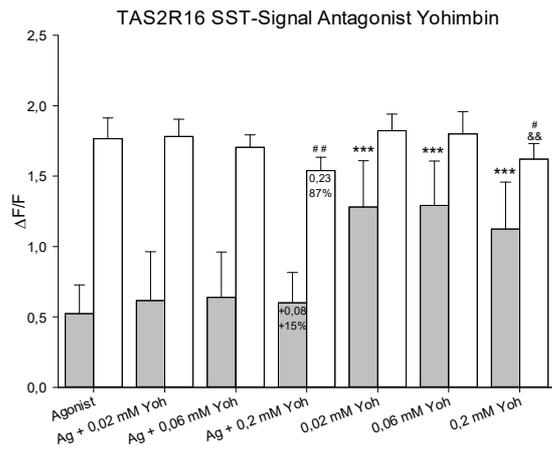
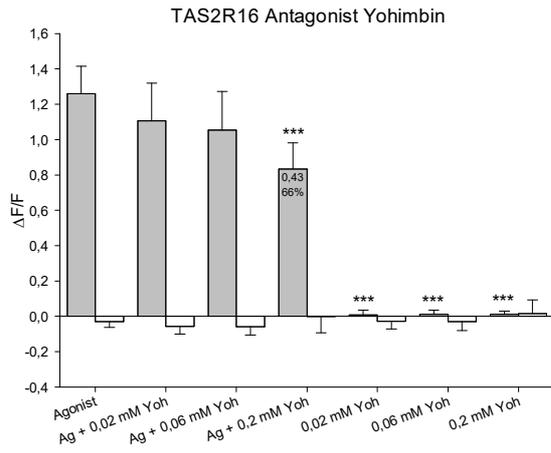












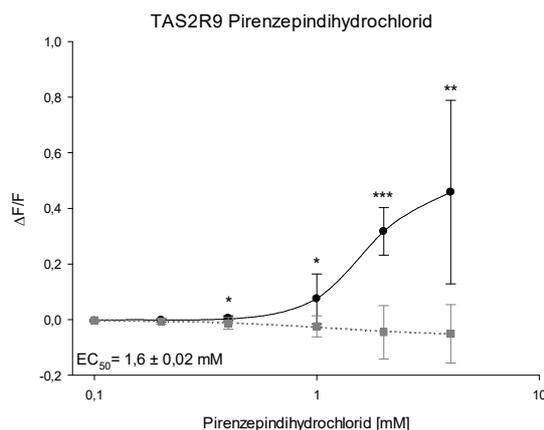


Abbildung 37: Dosis-Wirkungs-Experiment von Pirenzepin auf TAS2R9.

Gezeigt ist die Wirkung von Pirenzepindihydrochlorid auf TAS2R9-exprimierenden Zellen (schwarz) und Leervektor-transfizierten Zellen (grau), $n = 3 \pm$ Standardabweichung. Die Berechnung des EC_{50} -Wert ($1,6 \pm 0,02$ mM) erfolgte in SigmaPlot.

8.2 FL101237 als breitbandiger Inhibitor

Im Folgenden ist die Auswertung der Experimente mit allen durchgeführten Kontrollen gezeigt, welche in Abschnitt 3.4.1 in Auszügen gezeigt sind. Die Substanz FL101237 (FL) wurde in drei Konzentrationen jeweils mit und ohne Agonist auf die TAS2R-exprimierenden Zellen und die Leervektor-transfizierten Zellen appliziert (Erstapplikation). Auch die Calciumspuren der Somatostatin 14 Applikation (SST, Zweitapplikation) wurden ausgewertet.

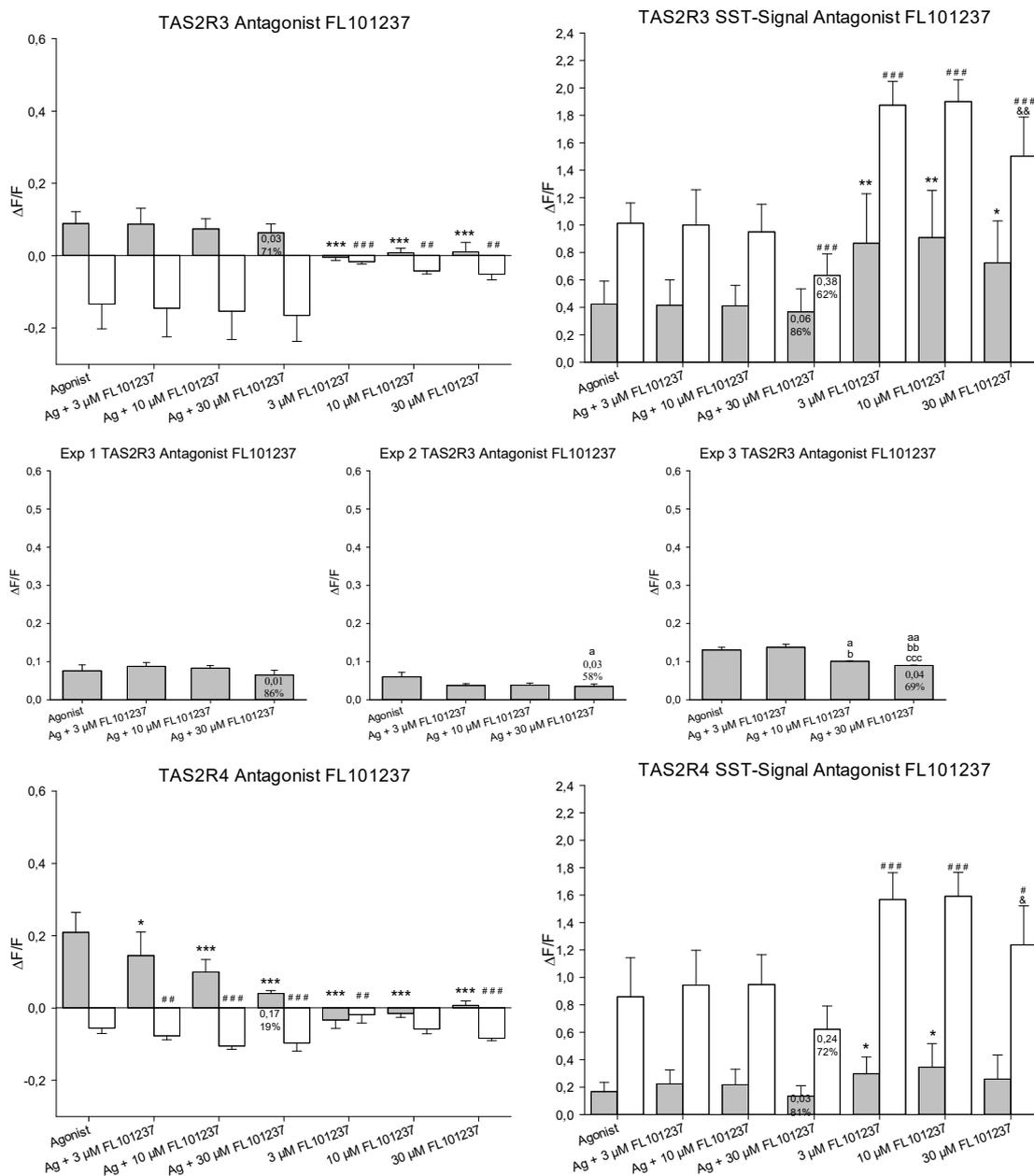
Auf der linken Seite ist die Auswertung der Fluoreszenzsignale der Erstapplikation der TAS2R-exprimierenden Zellen (grau) und der Leervektor-transfizierten Zellen (weiß) zu sehen, welche durch die Zugabe des Agonisten (Ag), durch FL101237 und deren Kombination miteinander hervorgerufen wurden, $n=3$, Messwerte \pm Standardabweichung.

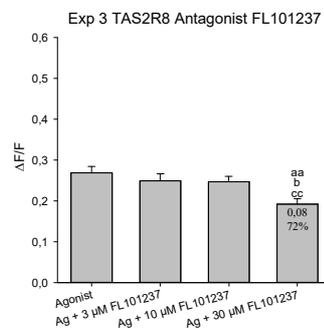
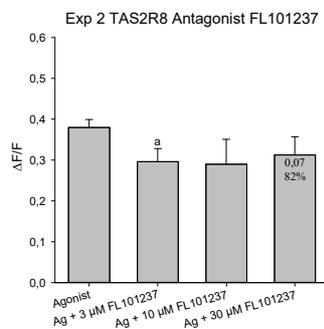
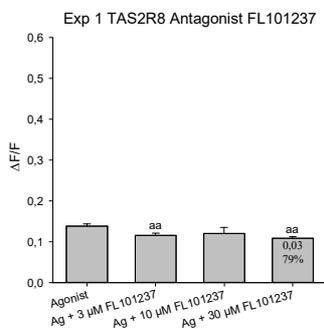
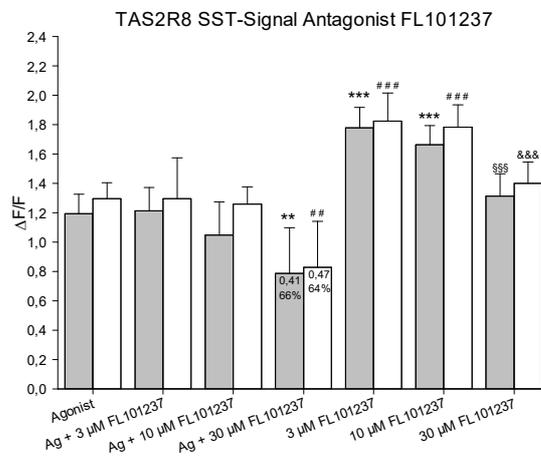
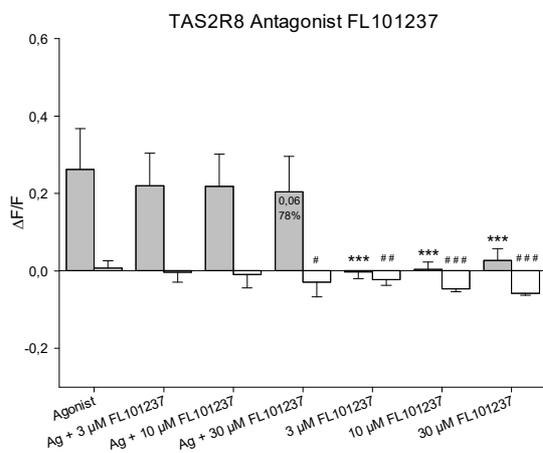
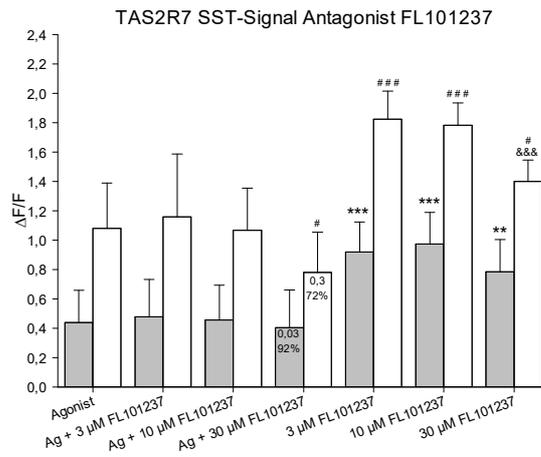
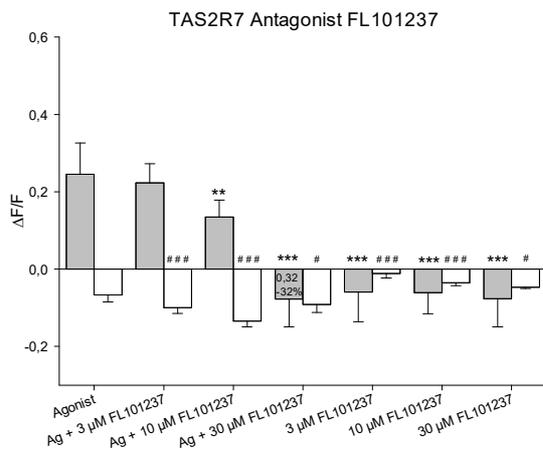
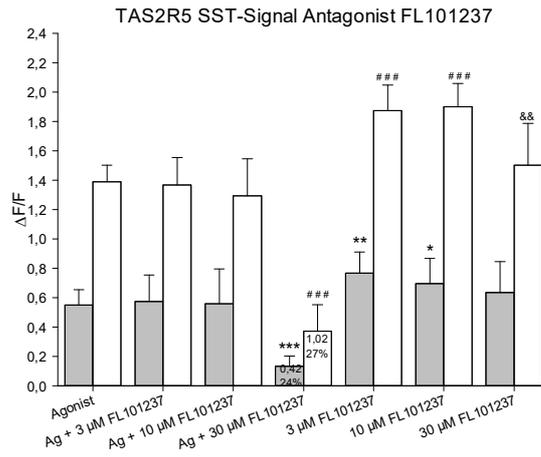
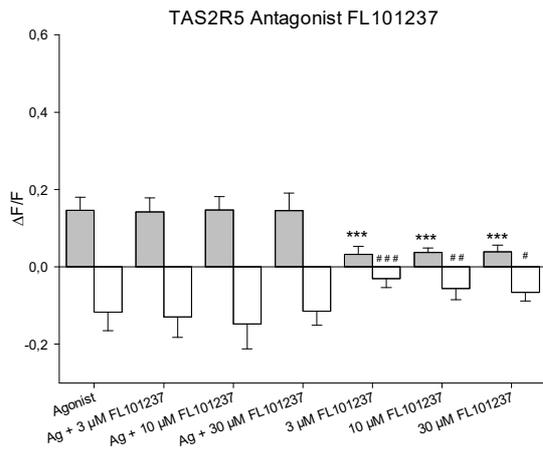
Nach der Zugabe der Testsubstanzen erfolgte die Applikation von Somatostatin 14 (SST). Die Graphen auf der rechten Seite zeigen die relativen Fluoreszenzsignale der Zweitapplikation der TAS2R-exprimierenden Zellen (grau) und der Leervektor-transfizierten Zellen (weiß), welche durch die Zugabe von SST hervorgerufen wurden, $n = 3$, Messwerte \pm Standardabweichung.

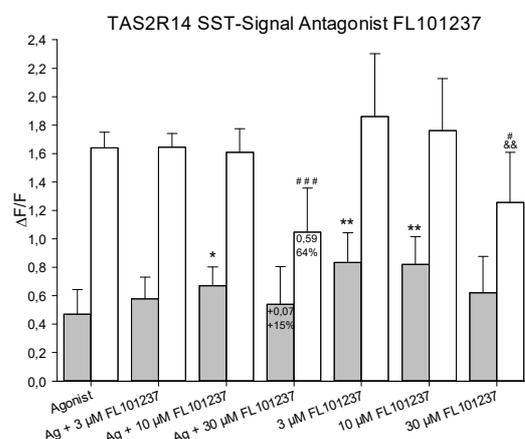
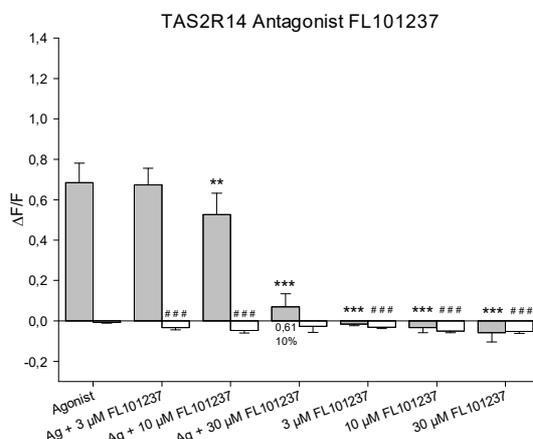
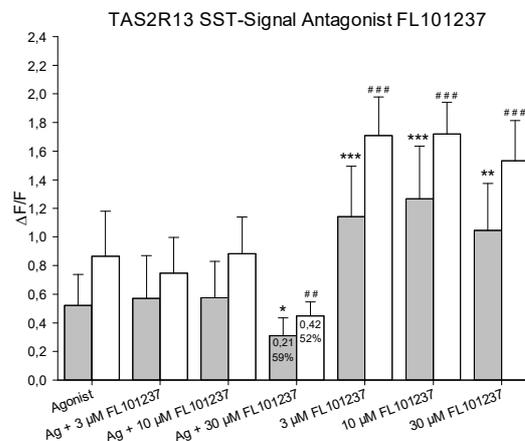
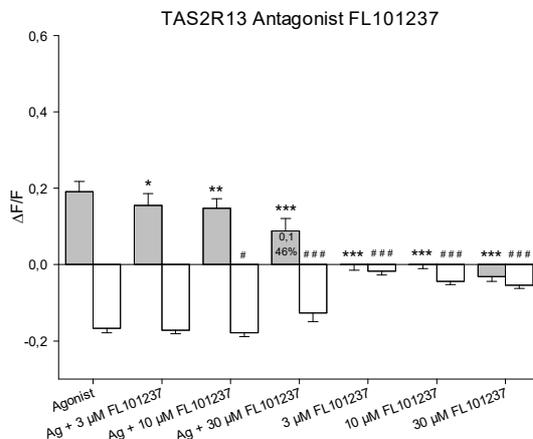
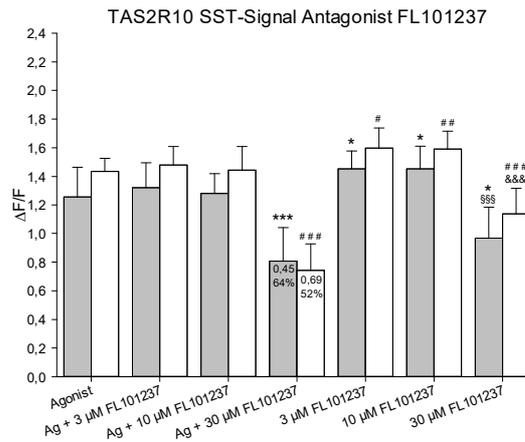
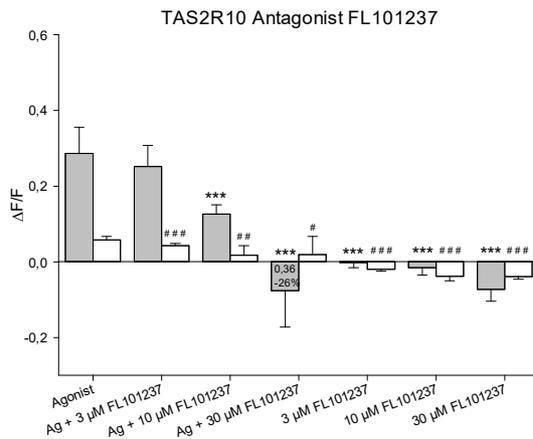
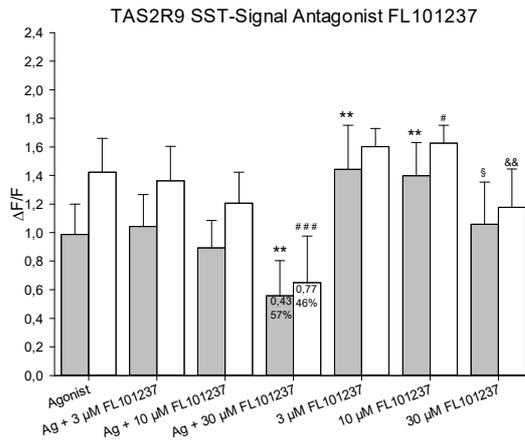
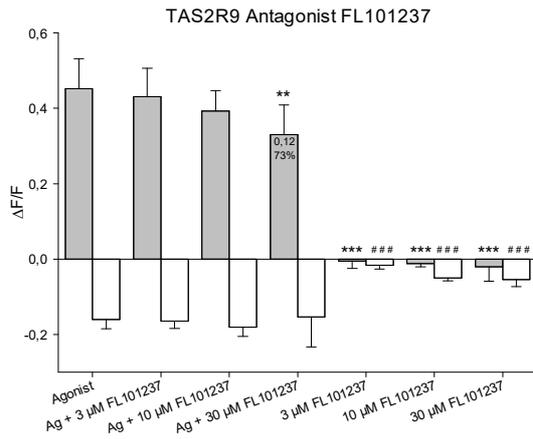
Die Reduktion des Agonisten-induzierten Signals von TAS2R3 und -R8 war nicht signifikant, daher sind zusätzlich die Einzelexperimente (Exp 1 bis 3) gezeigt (Agonist allein appliziert und simultane Applikation des Agonisten und FL101237 auf den TAS2R-exprimierenden Zellen). Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student'schen t-Test ermittelt. Dabei wurden jeweils die residualen Fluoreszenzwerte der TAS2R-transfizierten Zellen (*) bei alleiniger Applikation des Agonisten mit den Signalen der TAS2R-transfizierten Zellen bei simultaner Applikation von Agonist und FL101237, und bei alleiniger Applikation von FL101237 miteinander verglichen. Gleiches gilt für die Leervektor-transfizierten Zellen (#). Des Weiteren wurden die

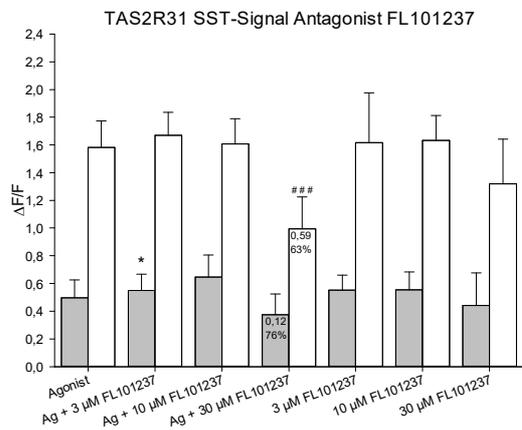
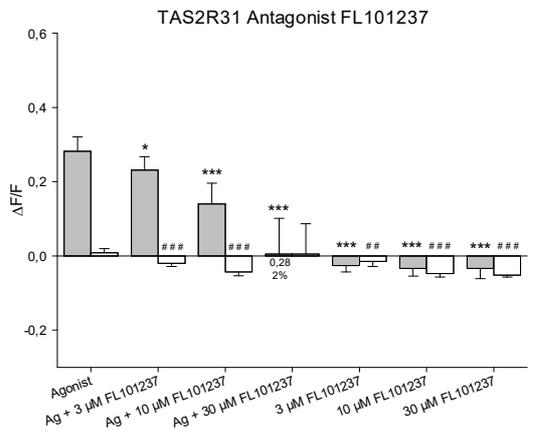
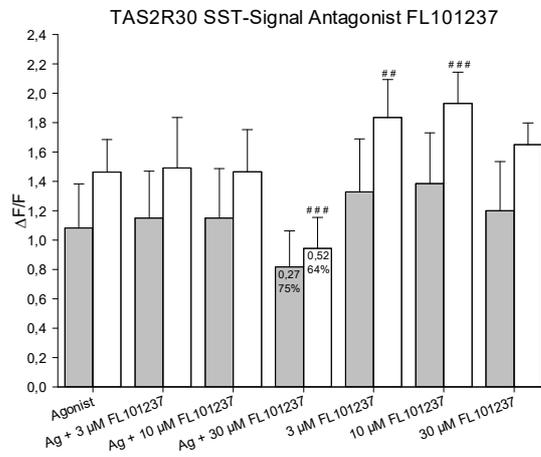
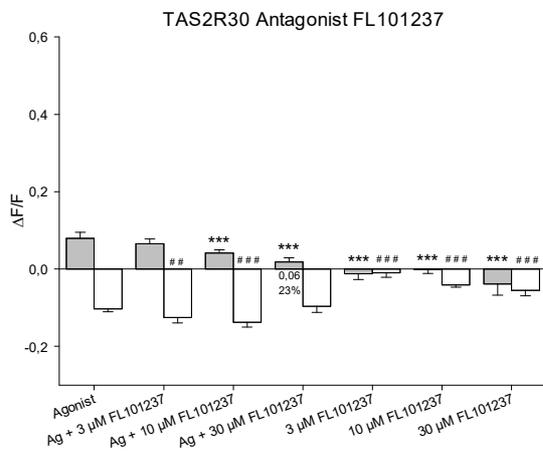
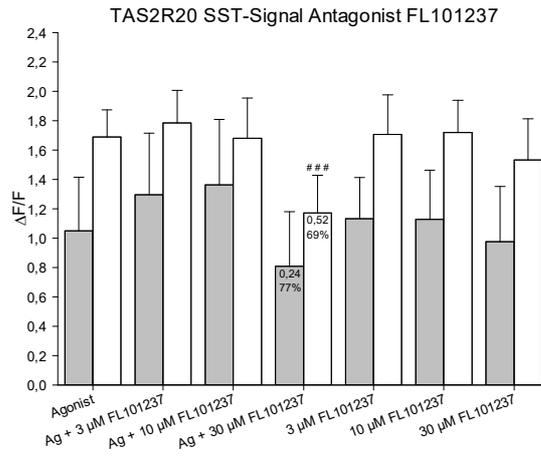
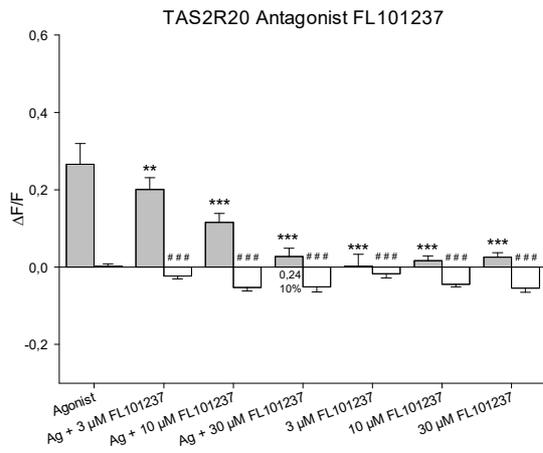
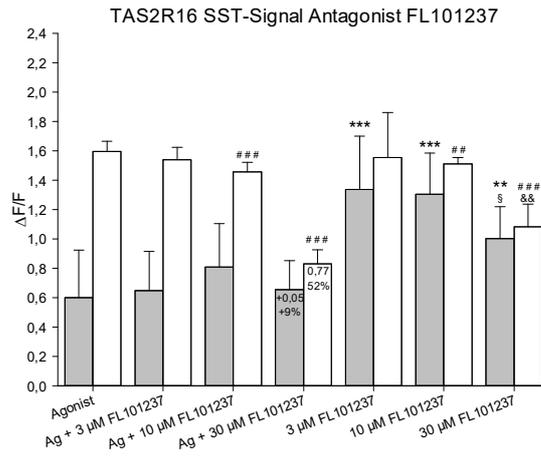
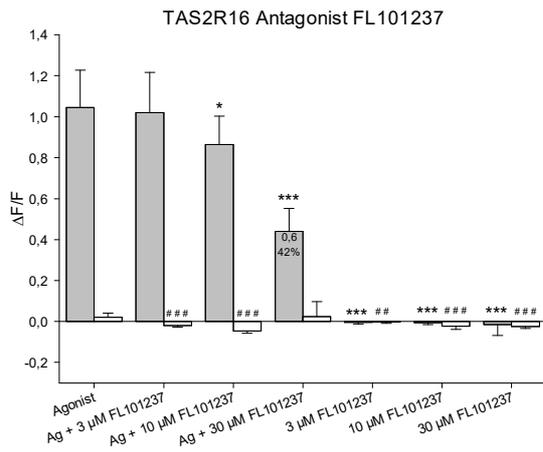
SST-Signale der TAS2R-transfizierten Zellen bei Applikation der niedrigsten Konzentration von FL101237 mit den höheren Konzentrationen von FL101237 auf statistische Signifikanz getestet (§). Dies wurde auch für die Leervektor-transfizierten Zellen durchgeführt (&). Für die Einzelerperimente wurden alle Wirkstoff-Kombinationen miteinander verglichen (a: signifikant zur alleinigen Applikation des Agonisten, b: signifikant zum Gemisch Agonist und 3 μ M FL101237, c: signifikant zum Gemisch Agonist und 10 μ M FL101237). Dabei gilt $p \leq 0,05$ 1 Zeichen; $p \leq 0,01$ 2 Zeichen; $p \leq 0,001$ 3 Zeichen.

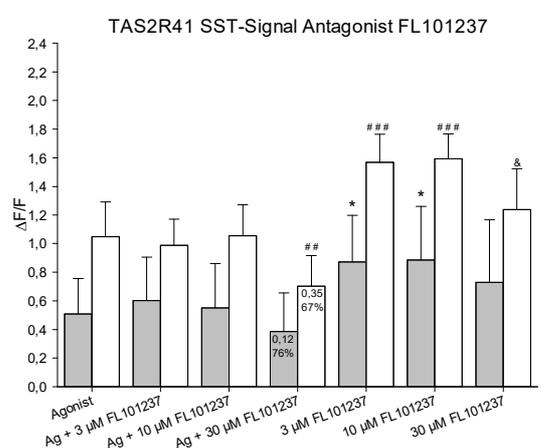
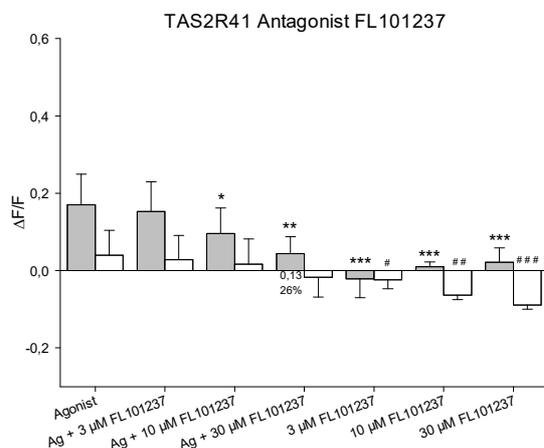
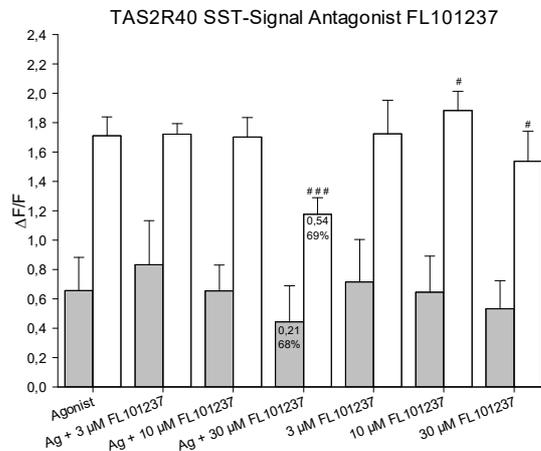
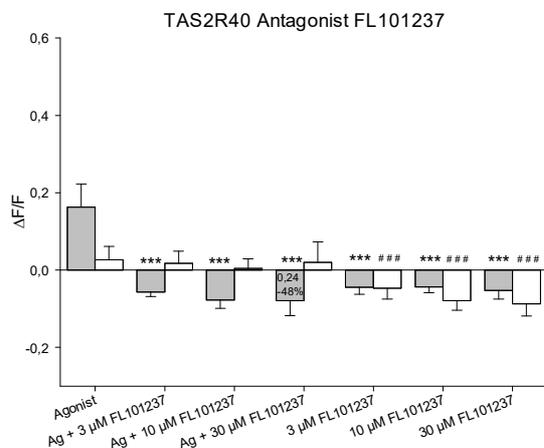
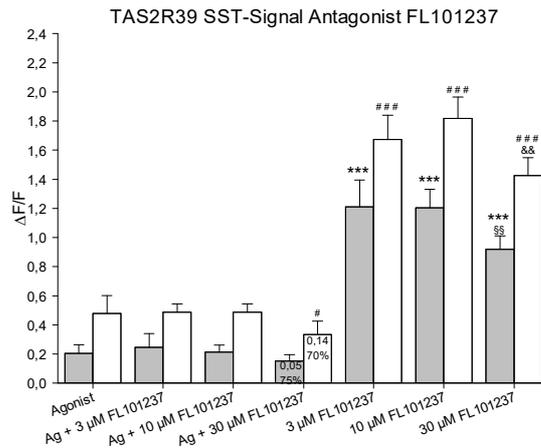
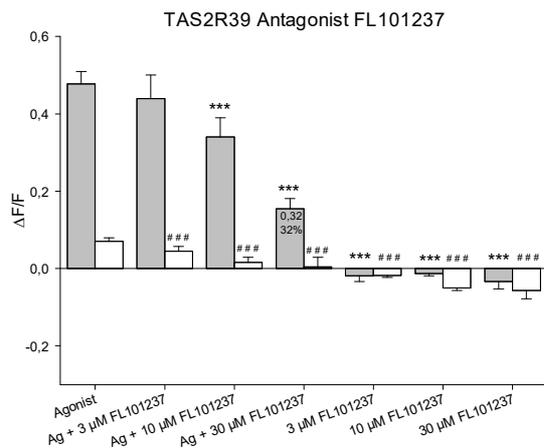
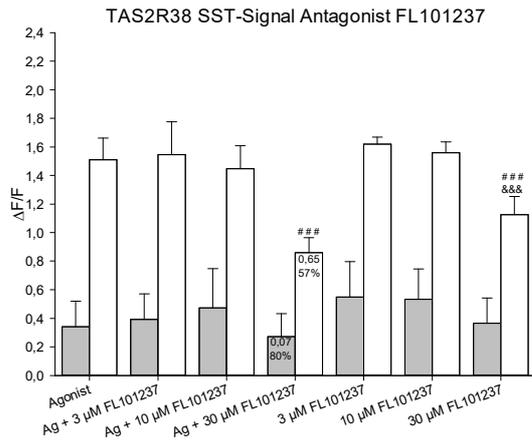
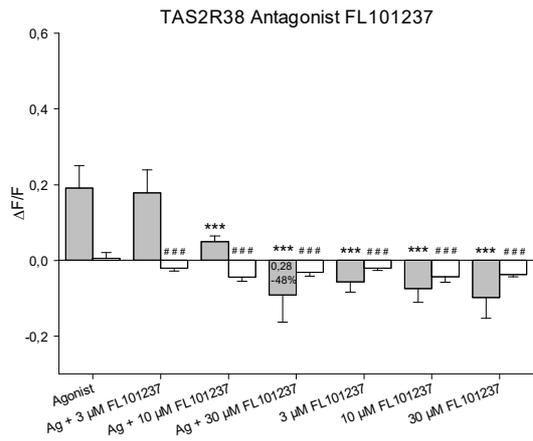
In den Graphen angegeben ist die Abnahme der relativen Fluoreszenzwerte der TAS2R- bzw. der Leervektor-transfizierten Zellen zwischen der alleinigen Applikation des Agonisten und der simultanen Zugabe des Agonisten und 30 μ M FL101237 (oben die Reduktion um $x \Delta F/F$, unten die Reduktion auf $x \%$).

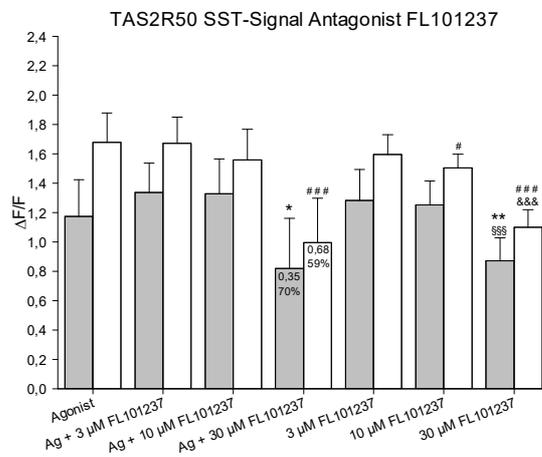
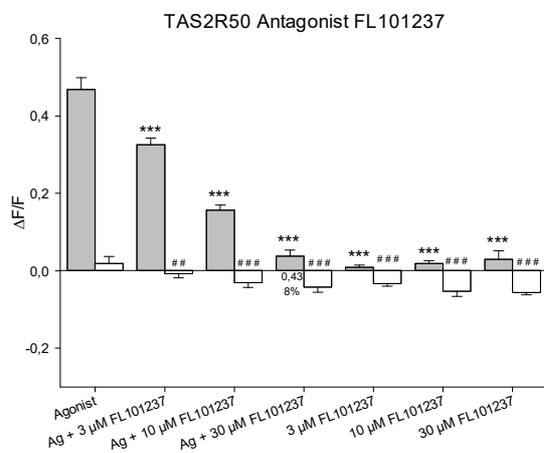
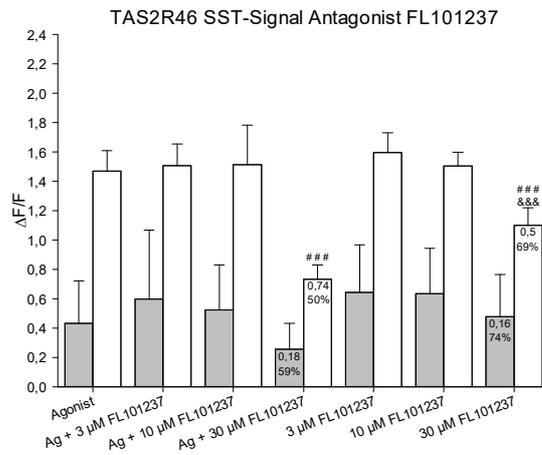
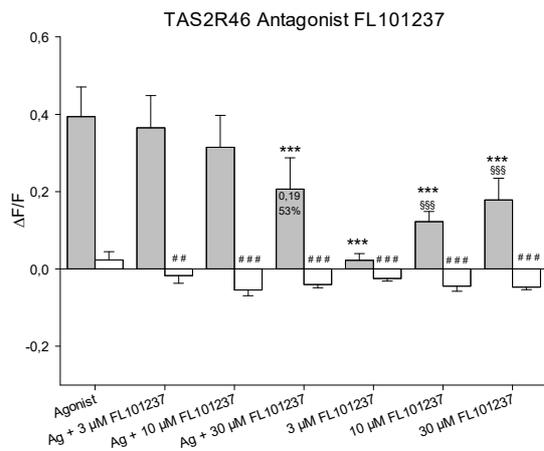
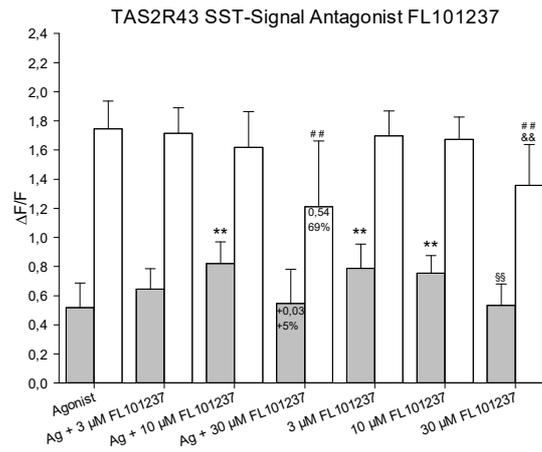
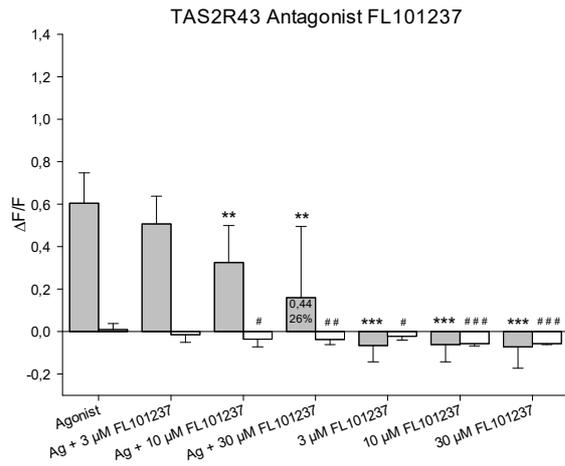


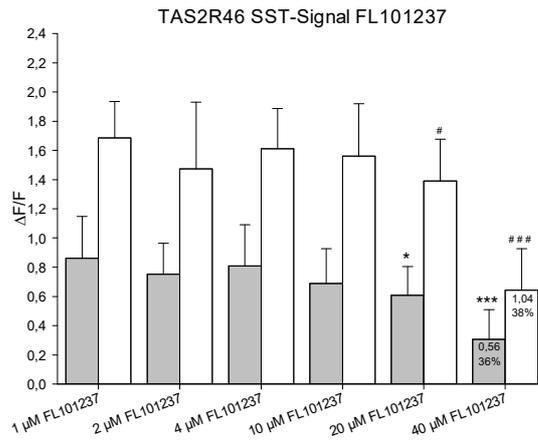
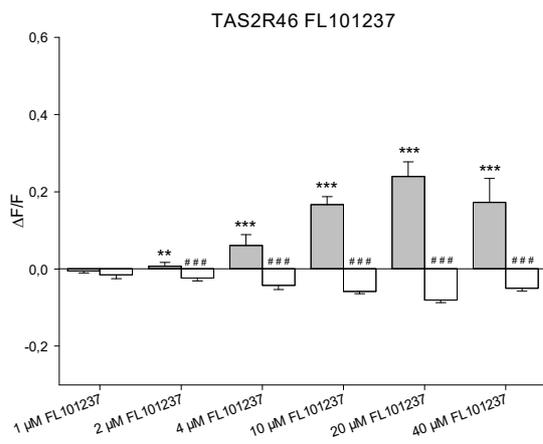
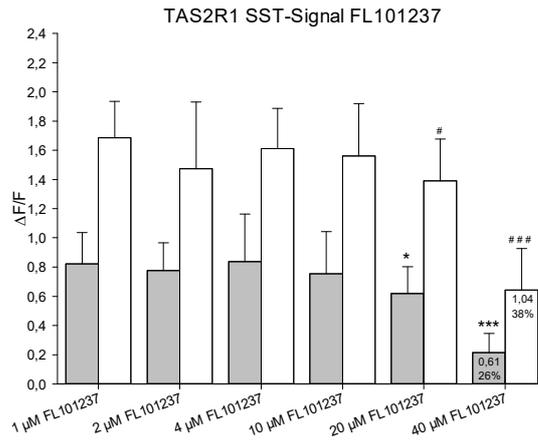
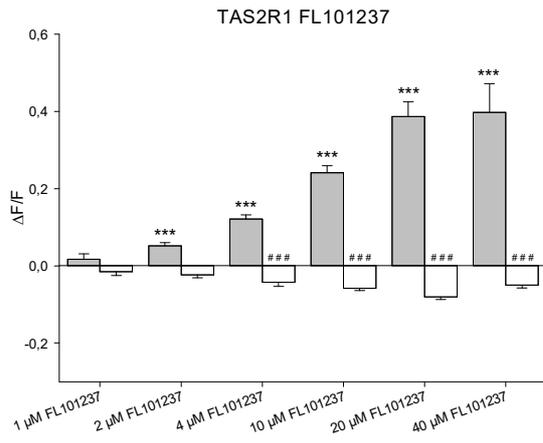












Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst wurde und ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet sowie wörtliche und sinngemäße Zitate als solche kenntlich gemacht habe.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Berlin, den 9. Juli 2018

Kristina Blank