

# Struktur- und Funktionsanalysen des humanen Bitterrezeptors TAS2R14 und seiner Agonisten

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:

Stefanie Nowak  
aus Berlin

2017

Diese Arbeit wurde am Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke in der Abteilung: Molekulare Genetik (Prof. Dr. Meyerhof) im Zeitraum 01.10.2011 – 14.02.2017 erstellt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof  
Deutsches Institut für Ernährungsforschung Potsdam-Rehbrücke  
Abteilung Molekulare Genetik  
Arthur-Scheunert-Allee 114 – 116  
14558 Nuthetal

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel  
FB Biologie, Chemie, Pharmazie  
Institut für Biologie, Mikrobiologie  
König-Luise-Straße 12-16  
14195 Berlin

Disputation am: 18.05.2017

## Danksagung

Nachdem ich meine Diplomarbeit am Institut für Humangenetik in einem komplett anderen Themengebiet absolviert habe, war ich begeistert, das TAS2R14-Projekt in Angriff nehmen zu dürfen. Für diese Möglichkeit möchte ich mich bei Prof. Dr. **Wolfgang Meyerhof** bedanken. Großer Dank geht an Dr. **Maik Behrens** für die hervorragende Betreuung während meiner Promotionszeit. Besonderer Dank gebührt ihm für die vielen Tipps bei der Gestaltung meiner Vorträge und bei der Unterstützung beim Verfassen von wissenschaftlichen Texten.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Team der Abteilung „Molekulare Genetik“ des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung für die reibungslose Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft unter den Kollegen bedanken. Besonderer Dank geht an **Ulrike Redel**, die mich während meiner Einarbeitungszeit unterstützte. Ebenfalls möchte ich Dr. **Natacha Roudnitzky** für die Unterstützung bei statistischen Fragen und Dr. **Jonas Töle** für seine Hilfsbereitschaft bei technischen Angelegenheiten danken.

Unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. **Masha Y. Niv**, Dr. **Anat Levit und Antonella Di Pizio** (Institute of Biochemistry, Food Science, and Nutrition, Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food, and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Israel), Dr. **Maximilian Peters** (Department of Medical Neurobiology, Institute of Medical Research Israel–Canada, The Hebrew University of Jerusalem, Israel) und Prof. Dr. **Rafik Karaman und Kollegen** (College of Pharmacy / Al-Quds University, Palestine) möchte ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit danken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung während der Doktorandenzeit bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

AB	Antibiotikum	GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
AK	Antikörper	HEK293	Humane embryonale Nierenzellen
AS	Aminosäure (AS-Code siehe Anhang)	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	HSV	Herpes simplex Virus
BGH	Bovines Wachstumshormon	ICL	Intrazelluläre Schleife
bp	Basenpaar	IC50	Effektive Konzentration bei halbmaximaler Inhibition
B.-W. Nr.	Ballesteros-Weinstein-Nummerierung	IP3	Inositoltriphosphat
CCK	Cholecystokinin	LBP-Modell	3D ligandbasierende Pharmakophor-Modell
CMV	Cytomegalievirus	NLS	Zellkern-Lokalisations-Signal
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	N-Terminus	Aminotermiales Ende
C-Terminus	Carboxyterminales Ende	OD	Optische Dichte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	OBP-Modell	3D oberflächenbasiertes Pharmakophor-Modell
DMSO	Dimethylsulfoxid	PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerasekettenreaktion
dNTP	2'Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
EC <sub>50</sub>	Effektive Konzentration halbmaximaler Aktivierung	PLC	Phospholipase C
ECL	Extrazelluläre Schleife	PTC	Phenylthiocarbamid
E.coli	Escherichia coli	SBP-Modell	3D strukturbasiertes Pharmakophor-Modell
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
ER	Endoplasmatisches Retikulum	nsSNP	nicht-synonymer SNP
EtBr	Ethidiumbromid	SST	Somatostatin
EtOH	Ethanol	TAE	Trisacetat EDTA Puffer
FKS	Fötale Kälberserum	TAS1R	Humaner Geschmacksrezeptor Klasse 1
FLIPR	Fluorometric Imaging Plate Reader	TAS2R	Humaner Geschmacksrezeptor Klasse 2
G418	Geneticin	TM	Transmembrandomäne
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor	Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan

Definitionen (Althaus, 2007; Herdegen, 2013; Hoyer et al., 1993)

Begriff	Definition
Effizienz	Effizienz ist die Kopplung zwischen Rezeptoraktivierung und beobachteter Wirkung
Potenz	als Potenz wird die auf die Dosis bezogene Wirkung bezeichnet
Vollagonist	Vollagonisten aktiviert einen Rezeptor mit maximaler bekannter Effizienz
Partialagonist	Partialagonisten aktiviert einen Rezeptor mit geringerer Effizienz verglichen zu Vollagonisten

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Der Geschmackssinn .....	1
1.2 Lokalisation der Geschmacksrezeptoren im Mund.....	2
1.3 Bedeutung von Geschmacksrezeptorzellen im extraoralen Gewebe .....	4
1.4 Transduktion und Weiterleitung der Bittergeschmacksinformation zum Gehirn .....	4
1.5 Die Rezeptoren der Bitterwahrnehmung.....	7
1.6 Bittersubstanzen: TAS2R14-Agonisten und ihre Wirkungen.....	9
1.7 Variationen der Rezeptorgene .....	11
1.8 Evolution der Bitterrezeptoren .....	13
1.9 Einordnung der Bitterrezeptoren .....	15
1.10 Identifikation der interagierenden Aminosäuren in den Bindungstaschen .....	16
1.11 Zielstellung dieser Arbeit .....	19
2. Material und Methoden .....	20
2.1 Material .....	20
2.1.1 Geräte .....	20
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	21
2.1.3 Standardpuffer und -lösungen .....	21
2.1.4 Kits .....	22
2.1.5 DNA-Marker / Leitern.....	22
2.1.6 Enzyme / Enzym Puffer .....	22
2.1.7 Oligonukleotide .....	22
2.1.8 Geschmacksstoffe.....	22
2.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.10 Software, Datenbanken und Online Programme .....	23
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	24
2.2.1 Mutagenese mittels PCR .....	25
2.2.2 Vorbereitung des punktmultierten Rezeptorfragments .....	27
2.2.3 Liniarisierung und Dephosphorylierung des Vektors.....	27
2.2.4 Ligation .....	28
2.2.5 Klonierung.....	28
2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	29
2.2.7 Kontrollverdau und Sequenzierung.....	29

---

2.2.8	Glycerin-Langzeitlagerung und DNA-Isolation.....	29
2.3	Zellbiologische Methoden.....	30
2.3.1	Beschichten der Kultivierungsgefäße.....	30
2.3.2	Kultivierung von HEK 293T-Zellen .....	30
2.4	Funktionsanalyse der heterolog exprimierten Bitterrezeptoren .....	30
2.4.1	Aussaat und Transfektion.....	31
2.4.2	Funktionelle Rezeptoranalyse über Kalzium-Detektion .....	31
2.4.3	Auswertung der gemessenen Fluoreszenzänderung und Interpretation.....	32
2.5	Immunzytochemische Bestimmung der Expressionseffizienz.....	34
2.5.1	Aussaat und Transfektion.....	34
2.5.2	Immunzytochemische Anfärbung .....	34
2.5.3	Visualisierung mit dem Konfokalmikroskop .....	35
2.6	Ballesteros-Weinstein-Nummerierung.....	36
3.	Ergebnisse .....	37
3.1	Charakterisierung der Bindungstasche des TAS2R14 .....	37
3.1.1	Funktionelle Charakterisierung der Alanin-punktmutierten TAS2R14- Varianten .....	40
3.1.2	Detaillierten Analysen der an der Ligandenbindung beteiligten Reste .....	45
3.1.3	Erweiterung des Testsubstanzen-Sets .....	56
3.1.4	Überprüfung der Bindungsmodi der verschiedene Agonisten mittels Docking-Modell-Analyse .....	62
3.1.5	Bedeutung der extrazellulären Schleifen.....	72
3.1.6	Wechselseitige Übertragung einzelner Aminosäurereste zwischen den Rezeptoren TAS2R14 und seinem nahen verwandten Bitterrezeptor TAS2R13. 77	
3.2	Untersuchung gemeinsamer TAS2R14-Agonistenstrukturen.....	79
3.2.1	Pharmakologische Charakterisierung der TAS2R14-Agonisten.....	79
3.2.2	Potenz und Effizienz einzelner TAS2R14-Agonisten.....	84
3.2.3	Gezielte Modifikation von TAS2R14-Agonisten.....	89
4.	Diskussion .....	98
4.1	Lokalisation der Bindungstasche .....	98
4.2	Bedeutung der extrazellulären Schleifen von TAS2Rs.....	99
4.3	Charakterisierung des TAS2R14 und seiner Bindungstasche.....	101
4.3.1	Stabilität der TAS2R14-Funktion gegenüber Rezeptormodifikationen.....	104
4.3.2	Flexibilität der TAS2R14-Bindungstasche .....	106

---

4.3.3	Anpassung der Bindungstasche für die Erkennung von vielen Agonisten.....	107
4.4	Agonisteneigenschaften der Bitterrezeptoren .....	109
4.4.1	Strukturelle Beschaffenheit der TAS2R14-Agonisten .....	109
4.4.2	Pharmakologische Wirkung der TAS2R14-Agonisten .....	111
5.	Zusammenfassung .....	115
6.	Summary .....	116
7.	Literaturverzeichnis.....	117
8.	Abbildungsverzeichnis .....	133
9.	Tabellenverzeichnis.....	135
10.	Anhang .....	136
10.1	DNA- und Aminosäure-Sequenz des TAS2R14 und TAS2R13.....	136
10.2	Vektorkarte und Klonierungskassette mit Sst3-Epitop und HSV-Epitop .....	137
10.3	Mutageneseprimer für die Erzeugung von Mutationen im TAS2R14 .....	138
10.4	Mutageneseprimer für die Erzeugung von Mutationen im TAS2R13 .....	139
10.5	Primer für den Austausch der extrazellulären Schleifen.....	140
10.6	Mutageneseschema: Austausch der extrazellulären Schleifen.....	141
10.7	Plattenschema für die funktionellen Rezeptormessungen.....	143
10.8	Aminosäuresequenz-Alignment und X50-Position nach Ballesteros und Weinstein.....	144
10.9	Funktionsanalysen mit erweitertem Testsubstanzen-Set.....	153
10.10	Expression und Lokalisation der punktmutierten Rezeptoren TAS2R14 .....	155
10.11	Publizierte Kristallstrukturanalysen von GPCRs .....	165
10.12	Eigenschaften der Aminosäuren.....	166
11.	Eidesstattliche Erklärung.....	168

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Geschmackssinn

Die Geschmackswahrnehmung dient der Qualitätsbeurteilung von Nahrung. Der Mensch kann die Geschmacksqualitäten süß, sauer, salzig, umami und bitter unterscheiden (Lindemann, 1996; Stewart et al., 1997). Diese fünf grundlegenden Geschmacksqualitäten werden über spezialisierte Zellen wahrgenommen, welche sich vorwiegend auf der Zunge und dem weichen Gaumen befinden (Hoon et al., 1999; Behrens et al., 2007; Chaudhari et al., 2010).

Die Wahrnehmung von süß, umami und salzig (Salzkonzentrationen < 100 mM NaCl) werden von Geburt an als angenehm empfunden (Beauchamp et al., 1990; Oka et al., 2013) und somit wird die Aufnahme in den Körper begünstigt (Steiner, 1977). Die Süß- und Umami-Geschmäcke werden über Rezeptoren der TAS1R-Familie vermittelt. Die Vermittlung des Süßgeschmacks erfolgt über das Dimer aus TAS1R2 und TAS1R3 (Nelson et al., 2001; Li et al., 2002). Die Mono- und Disaccharide, welche die Süßwahrnehmung auslösen, dienen als Energielieferant (Anderson, 1995; Chandrashekar et al., 2006). Das Dimer aus TAS1R1 und TAS1R3 stellt den Umami-Rezeptor dar. Er wird beispielsweise durch L-Glutamat, welches in Fleisch vorkommt, aktiviert und ermöglicht die Wahrnehmung von aminosäurereicher Nahrung (Li et al., 2002; Nelson et al., 2002; Zhang et al., 2003, Chandrashekar et al.; 2006). Die Aktivierung dieser Rezeptoren löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus (siehe Kapitel:1.4), woraus die Erregung der Geschmacksrezeptorzelle resultiert (Zhang et al., 2003).

Der Salzgeschmack ist für den Erhalt des Elektrolythaushalts wichtig. Mit dem ENaC (Epithelial sodium channel)-Inhibitor Amilorid konnte der Nachweis erbracht werden, dass niedrige Salzkonzentrationen über ENaC den Salzgeschmack von Raten und Fröschen (*Rana esculenta / ridububda*) vermitteln (Avenet et al., 1988; Heck et al., 1984). Die Aufnahme von Natriumionen erfolgt direkt über Ionenkanäle, was zur Änderung des Membranpotentials der Geschmacksrezeptorzelle führt (Lindemann, 2001). Amilorid verhindert jedoch nicht die Wahrnehmung von hohen Salzkonzentrationen (über ~150 mM) (Chandrashekar et al., 2010).

Starker Sauergeschmack ruft ein angeborenes Aversionsverhalten hervor (Steiner, 1977) und schützt vor der Aufnahme von unreifen Früchten oder verdorbenen Speisen (Huang et al., 2006; Kinnamon et al., 1996; Lindemann, 2001).

Der Sauergeschmack wird direkt vermittelt, indem Protonen (Wasserstoffionen) über Ionenkanäle aufgenommen werden und unmittelbar Aktionspotentiale der Geschmackssinneszellen auslösen (Chang et al., 2010; Roper, 2013). Für die Vermittlung des Sauergeschmacks kamen die TRP-Kanäle PKD2L1 und PKD1L3 in Frage (Huang et al., 2006;



Nelson et al., 2010; Horio et al., 2011). Der PKD2L1-Kanal konnte zwar als ein Sauer Geschmackssinneszellmarker identifiziert werden, aber für die Signalübertragung ist er nicht zuständig. Des Weiteren wurden HCN-Kanäle, der ASIC-Kanal und weitere Kalium-Kanäle als Kandidaten untersucht (Stevens et al., 2001; Richter et al., 2004; Dotson, 2010).

Die Arbeitsgruppe Liman beschrieb 2016, dass die Protonen der Säure in die Geschmackszelle über Kanäle einströmen bzw. durch die Zellmembran diffundieren. Diese Protonen im Zellinneren sollen dann den Kaliumionen-Ausstrom über den K<sup>+</sup>-Kanal, KIR2.1 inhibieren und somit über die Depolarisierung der Zelle den Sauer Geschmack vermitteln (Ye et al., 2016).

Der Bitter Geschmack wird hauptsächlich als Warnsignal vor der Einnahme von toxischen Substanzen angesehen (Hankins et al., 1976; Glendinning, 1994). Das Signal für die Geschmackswahrnehmung wird, ähnlich wie bei süß und umami, über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Dabei handelt es sich um Rezeptoren der TAS2R Familie (Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000). Der Mensch besitzt etwa 25 funktionelle TAS2R-Rezeptoren (Bufe et al., 2002).

## 1.2 Lokalisation der Geschmacksrezeptoren im Mund

Die Geschmackswahrnehmung beim Menschen wird hauptsächlich über Geschmackssinneszellen der Zunge (Lalonde et al., 1961; Loven, 1868), aber auch des weichen Gaumens (Kaplick, 1953), des Rachens (Pharynx), des Kehlkopfs (Larynx) und des Kehlkopfdeckels (Epiglottis) vermittelt (Lalonde et al., 1961).

Die Geschmackssinneszellen sind zu Geschmacksknospen gebündelt und kommen auf der Zunge in Wallpapillen, Blätterpapillen und in den Pilzpapillen vor (Abbildung 1).

Eine Geschmacksknospe setzt sich aus vier unterschiedlichen Hauptzelltypen, Zelltyp I bis III, und den Basalzellen zusammen (Farbman, 1965; Murray, 1986).

Der Zelltyp I (glia-ähnliche Zellen) exprimiert GLAST, einen Glutamat-Aspartat-Transporter (Lawton et al., 2000) und NTPDase2, ein ATP-abbauendes Enzym, welche dafür sorgen, dass der Neurotransmitter ATP aus dem extrazellulären Raum wieder entfernt wird, um eine Desensibilisierung der purinergen Rezeptoren auf den afferenten Nervenfasern zu vermeiden (Bartel et al., 2006; Vandenbeuch et al., 2013). Des Weiteren wurde in einem Teil der Typ-I-Zellen die Expression von ENaC als Rezeptorkandidat für die Salzwahrnehmung nachgewiesen (Vandenbeuch et al., 2008).

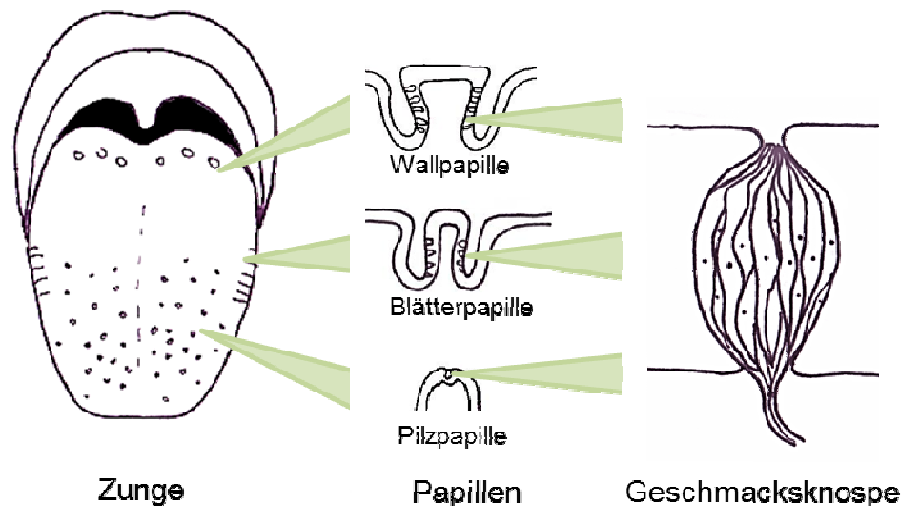


Abbildung 1: Lokalisation der Geschmacksrezeptoren auf der Zunge

Auf der Zunge befinden sich Wallpapillen, Blätterpapillen und Pilzpapillen. Diese tragen Geschmacksknospen, welche eine Bündelung von Geschmackssinneszellen darstellen. In der Zellmembran der Geschmackssinneszellen befinden sich die Geschmacksrezeptoren.

Die Süß-, Umami- und Bitterrezeptoren sind in Typ-II-Zellen lokalisiert. Jedoch befinden sich in jeder einzelnen Zelle nur Rezeptoren für eine der drei Geschmacksqualitäten (Nelson et al., 2001; Tomchik et al., 2007). Chandrashekar und Kollegen gingen davon aus, dass jede einzelne Geschmackssinneszelle alle Bitterrezeptoren exprimiert und somit auf die Vielfalt an verschiedenen Bitterstoffen mit einem einheitlichen Signal an das Gehirn reagiert (Chandrashekar et al., 2000).

Weitere Untersuchungen widerlegten diese Annahme, indem sie Nachweise für die unterschiedliche Genexpression der verschiedenen Bittergeschmacksrezeptoren erbrachten (Behrens et al., 2007; Caicedo et al., 2002; Chandrashekar et al., 2000; Matsunami et al., 2000).

Die Zellen des Typs III exprimieren SNAP25 und andere präsynaptische Proteine, wie den spannungsabhängigen Kalziumkanal  $\alpha 1A$ , Synapsin-II, das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD1) und die Aromatische-Aminosäure-Decarboxylase (AADC), welche für die Neurotransmittersynthese notwendig sind (Yee et al., 2001; DeFazio et al., 2006). Des Weiteren wird vermutet, dass die Typ-III-Zellen für die Sauerwahrnehmung verantwortlich sind (Huang et al., 2006; Huang et al., 2008).

Am Grund der Geschmacksknospe im umgebenden Epithelium befinden sich die Basalzellen, welche als undifferenzierte und unreife Zellen als Quelle für neue Geschmackssinneszellen dienen (; Farbman, 1965; Chaudhari et al., 2010; Perea-Martinez et al., 2013).

### 1.3 Bedeutung von Geschmacksrezeptorzellen im extraoralen Gewebe

Die Bittergeschmacksrezeptoren befinden sich nicht nur in Geschmackssinneszellen auf der Zunge, wo sie als Instrument der Bittergeschmackswahrnehmung funktionieren, sondern konnten auch in anderen Geweben, beispielsweise im Magen-Darm-Trakt, Harn- und Atmungssystem bei Nagern identifiziert werden (Wu et al., 2002 ; Finger et al., 2003; Deckmann et al., 2014).

Interessanterweise wird die Hälfte aller humanen TAS2R-Familie im linken Ventrikel des Herzens exprimiert (Foster et al., 2013). Bemerkenswert ist die hohe Expression des TAS2R14, welche vergleichbar mit der Expressionsmenge des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors (ADRB1) ist. Die funktionelle Bedeutung ist noch unklar, jedoch liefert dieser Befund einen Hinweis auf die hohe Bedeutung des TAS2R14 unter den extraoralen Bitterrezeptoren.

Die jüngst publizierten Untersuchungen zeigten die Expression aller humanen Bitterrezeptoren in Leukozyten im Blut und lassen vermuten, dass Bitterstoffe einen Einfluss auf das Immunsystem haben (Malki et al., 2015).

Das extraorale Vorkommen von Bitterrezeptoren könnte möglicherweise die Aufnahme von Medikamenten im Darm beeinflussen (Jeon et al., 2008).

Die Expression des TAS2R14 in extraoralen Organen wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, wird thematisch jedoch in der Diskussion aufgegriffen.

### 1.4 Transduktion und Weiterleitung der Bittergeschmacksinformation zum Gehirn

Sensorische Experimente mit Mäusen, bei denen das Gen für  $\alpha$ -Gustducin, ein Guanin-Nukleotid-bindendes Protein (G-Protein), genetisch entfernt wurde, zeigten, dass diese Mäuse kaum in der Lage waren, süß oder bitter (Wong, 1996) oder umami (Ruiz et al., 2003) zu schmecken. Wong *et al.* schlussfolgerte, dass  $\alpha$ -Gustducin sowohl bei der Süß- als auch der Bitterwahrnehmung ein Bestandteil der Signalkaskade zur Informationsweiterleitung darstellt. Sie lokalisierten mit Hilfe von radioaktiv markiertem  $\alpha$ -Gustducin dessen Lage in Geschmackspapillen. Die Co-Expression von  $\alpha$ -Gustducin und der TAS2R-Familie konnte im Jahr 2000 nachgewiesen werden (Adler et al., 2000). Im gleichen Jahr wurde der funktionelle Beweis der Aktivierung der Bitterrezeptoren durch Bitterstoffe erbracht (Chandrashekar et al., 2000). Der Einsatz von Antikörpern gegen eine der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten G $\beta$ 3, G $\gamma$ 13, oder gegen PLC $\beta$ 2 in präpariertem Mauszungengewebe resultierte in der Unterdrückung des interzellulären Anstiegs von Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3) (Palmer et al., 1989; Cook et al., 1990; Huang et

al., 1999; Rossler et al., 2000). Huang und Kollegen vermuteten, dass  $\alpha$ -Gustducin die Phosphodiesterase (PDE) reguliert und die Phospholipase C $\beta$ 2 (PLC $\beta$ 2) durch G $\beta\gamma$  aktiviert wird (Huang et al., 1999). Die PLC $\beta$ 2 hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) (Rossler et al., 1998). Das führt zum intrazellulären Anstieg von IP $_3$ , wodurch sich die IP $_3$ -abhängiger Kanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums öffnen und den Anstieg von Ca $^{2+}$  im Zytosol verursachen. Der Kalziumanstieg aktiviert die TRPM5-Kanäle und initiiert ein Na $^+$ -Ionen-Einstrom (Perez et al., 2002; Liu et al., 2003). Zhang und Kollegen zeigten durch Nervenableitungen und Geschmackspräferenztests, dass eine Aktivierung der Zellen durch bittere Substanzen bei genveränderten C57BL/6-Mauslinien ohne Expression von TRPM5 oder PLC $\beta$ 2 nicht mehr möglich ist (Zhang et al., 2003).

Zur Reizweiterleitung wurde Adenosintriphosphat (ATP) als Neurotransmitter identifiziert, welches aus den Typ II-Zellen in den extrazellulären Raum gelangt und somit einen synaptisch unabhängigen Mechanismus der Reizweiterleitung darstellt (Huang et al., 2007; Romanov et al., 2008; Murata et al., 2010). Für diese Reizweiterleitung kommen Kanäle, wie Kalzium Homeostasis Modulator 1 (CALHM1), Pannexin1 (Panx1), Connexin 30 und Connexin 43, welche alle in Typ II-Zellen vorkommen, in Frage (Vandenbeuch et al., 2015). An Calhm1-Knockout-Mäusen konnte eine starke Beeinträchtigung der Wahrnehmung von süß, bitter und umami Substanzen, nicht aber für saure und salzige Stimuli, festgestellt werden (Taruno et al., 2013). Da die süß, bitter und umami Wahrnehmung bei Calhm1-Knockout-Mäusen nicht völlig verloren gegangen ist, wird angenommen, dass noch weitere Kanäle beteiligt sind (Vandenbeuch et al., 2015). Daraufhin wurden Panx1-Knockout-Mäuse untersucht und eine unveränderte ATP-Freisetzung festgestellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass Panx1 nicht an der Weiterleitung des Signals beteiligt ist.

Adenosintriphosphat aktiviert den dimeren purinergen Rezeptor P2X2/P2X3, wodurch das Signal auf die afferenten Nervenfasern übertragen und somit weiterleitet wird (Finger et al., 2005; Eddy et al., 2009;).

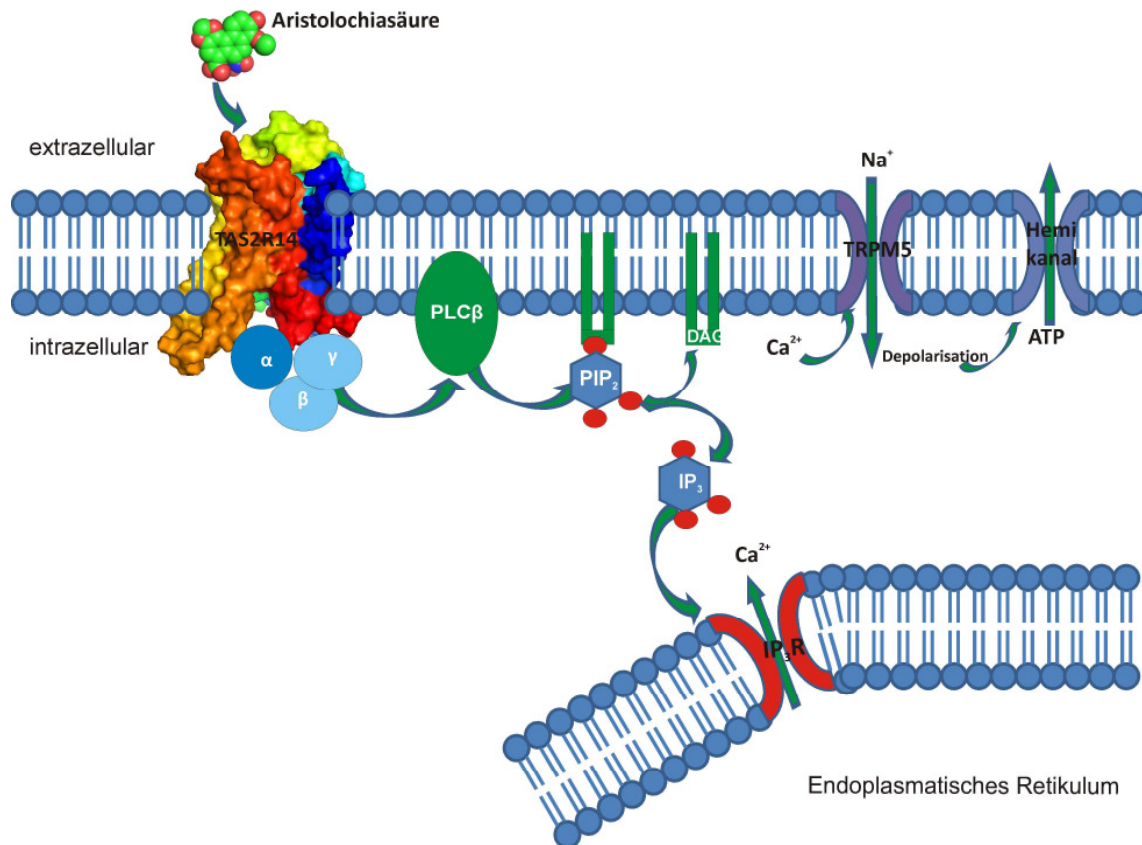


Abbildung 2: Signaltransduktion der Bitterwahrnehmung

Ein TAS2R14-Agonist z.B.: Aristolochiasäure aktiviert den TAS2R14-Bitterrezeptor, wodurch sich die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta\gamma$  des heterotrimeren G-Proteins Gustducin vom Rezeptor lösen. Die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktivieren dann die membranständige Phospholipase C $\beta_2$  (PLC $\beta$ ), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) durchführt. Das IP<sub>3</sub> aktiviert den IP<sub>3</sub>-Rezeptor, welcher Kalziumionen vom endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der Zelle entlässt. Die Ca<sup>2+</sup>-Ionen aktivieren den TRPM5-Kanal und verursachen einen Na<sup>+</sup>-Einstrom in die Zelle und die resultierende Depolarisierung verursacht einen ATP-Ausstrom durch einen Hemikanal.

Um die Reizverarbeitung für die Geschmackswahrnehmung zu gewährleisten, wird der Reiz über afferente Nervenfasern dreier Hirnnerven zum Gehirn übertragen (Guth, 1957; Hanamori et al., 1988; Belecky et al., 1990;). Der Hirnnerv VII (*N. facialis*) wird von den Geschmacksknospen der Pilzpapillen des vorderen und mittleren Teils der Zunge sowie über Nervus petrosus Major vom Gaumen angeregt (Miller et al., 1982; Belecky et al., 1990). Die Geschmacksknospen der Blätterpapillen und Wallpapillen des hinteren Teils der Zunge aktivieren den IX. Hirnnerv (*N. glossopharyngeus*) (Guth, 1957; Hanamori et al., 1988) und der X. Hirnnerv (*N. trigeminus*) leitet die Erregungen von der Geschmacksknospen des Pharynx, der Epiglottis und des Larynx (Lalonde et al., 1961) zum Gehirn weiter.

Im Gehirn des Menschen wird die Information direkt vom NTS (*Nucleus tractus solitarii*) (Norgren, 1978; Hamilton et al., 1984) zum Thalamus geleitet und von dort zum primären gustatorischen Kortex (Travers, 1988).

## 1.5 Die Rezeptoren der Bitterwahrnehmung

Die verschiedenen Bitterrezeptoren, ermöglichen uns viele chemisch unterschiedliche Substanzen wahrzunehmen.

Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts wurde vermutet, dass diese Vielfalt an Bittersubstanzen über eine große Gruppe von G-Proteinen und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren abgedeckt wird (Margolskee, 1993; Lindemann, 1996; Wong, 1996). Im Jahr 2000 wurde eine Gruppe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die TAS2R-Familie, in den Geschmacksrezeptorzellen der Zunge und des Gaumens identifiziert (Adler et al., 2000; Matsunami et al., 2000). Chandrashekar und Kollegen erbrachten den funktionellen Beweis, dass die TAS2R-Familie für die Bittergeschmackswahrnehmung verantwortlich sind (Chandrashekar et al., 2000). Sie zeigten die Aktivierung des Mausbitterrezeptors Tas2r105 (mT2R5) durch Cycloheximid und wiesen auf die Aktivierung des humanen Rezeptors TAS2R4 durch Denatoniumbenzoat und 6-N-Propyl-2-thiouracil. Dies erfolgte mittels heterologer Expression der Bitterrezeptoren in HEK293-Zellen mit einer stabil transfizierten  $G_{\alpha 15}$ -Untereinheit der funktionellen Rezeptoranalyse über Kalzium-Detektion unter Verwendung des kalziumsensitiven Farbstoffs FURA-2AM nach (Chandrashekar et al., 2000). Im Jahr 2002 beschrieben Bufe und Kollegen die Aktivierung des Rattenrezeptors Tas2r109 (T2R9) durch Cycloheximid und die Aktivierung der humanen Bitterrezeptoren TAS2R16 durch Salicin und TAS2R10 durch Strychnin mit einem ähnlichen Versuchsaufbau (Bufe et al., 2002).

Untersuchungen des TAS2R14 zeigten die Aktivierung des Rezeptors durch chemisch unterschiedliche Agonisten, darunter Pikrotoxinin und  $\alpha$ -Thujon unter Verwendung von HEK293T- $G_{\alpha 16}$ Gust44-Zellen und der funktionellen Rezeptoranalyse über Kalzium-Detektion (Behrens et al., 2004). Bei der Zelllinie HEK293T- $G_{\alpha 16}$ Gust44 handelt es sich um adhärent wachsende HEK 293T-Zellen, welche stabil die G-Protein-Chimäre  $G_{\alpha 16}$ Gust44 (Chimäre aus der  $G_{\alpha 16}$ -Untereinheit und 44 AS vom C-Terminus von  $\alpha$ -Gustducin (Ueda et al., 2003)) exprimieren. Des Weiteren wurde die Aktivierung durch Aristolochiasäure des TAS2R14 mit dem GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment nachgewiesen (Sainz et al., 2007). Auch die Rezeptoren TAS2R31 und -R43 zeigten eine Aktivierung durch Aristolochiasäure (Kuhn et al., 2004). Kuhn *et al.* zeigte außerdem die Aktivierung des TAS2R31 und -R43 durch die künstlichen Süßstoffe, Saccharin und Acesulfam K, welche durch einen bitteren Beigeschmack in hohen Konzentrationen gekennzeichnet sind (Kuhn et al., 2004).

Im gleichen Jahr wiesen Pronin und Kollegen die Aktivierung des TAS2R30 (alte Bezeichnungen: T2R44, TAS2R47) durch Denatonium und 6-Nitrosaccharin nach und zeigten

die Bedeutung der extrazellulären Schleifen der Rezeptoren TAS2R31 (alte Bezeichnung: T2R64) und TAS2R43 (alte Bezeichnung: T2R61). Nach der Übertragung der extrazellulären Schleifen des TAS2R43 auf den TAS2R31-Rezeptor konnte diese Chimäre nun durch den TAS2R43-Agonisten 6-Nitrosaccharin aktiviert werden (Pronin et al., 2004).

Eine genetische Kopplungsanalyse konnte den Zusammenhang zwischen Phenylthiocarbamid (PTC) und dem TAS2R38 zeigen (Kim et al., 2003). Experimentell gelang 2005 der direkte Nachweis von PTC als TAS2R38-Agonist (Bufe et al., 2005) (weitere Details zu diesem Rezeptor und seinen Rezeptorvarianten siehe Kapitel 1.7).

2007 gelang die Deorphanisierung des Rezeptors TAS2R7 durch Aktivierung mit Strychnin, Quinacrin, Chloroquin, Papaverin (Sainz et al., 2007), des TAS2R1 mit Peptiden (Maehashi et al., 2008) und des TAS2R46 mit Strychnin (Brockhoff et al., 2007). Die ersten Agonisten vom TAS2R9 waren Ofloxacin, Procainamid und Pirenzopin (Dotson et al., 2008). Humulon, der Bitterstoff aus Bier, konnte die Rezeptoren TAS2R1, -R14 und -R40 aktivieren (Intelmann et al., 2009).

2010 wurden 104 bitter schmeckende Substanzen auf ihre TAS2R-Aktivierung getestet. Dabei konnten für weitere Rezeptoren Agonisten gefunden und somit deren Funktionalität bewiesen werden (Meyerhof et al., 2010). Die jüngste Deorphanisierung gelang bei dem Rezeptor TAS2R41 mit Chloramphenicol (Thalman et al., 2013).

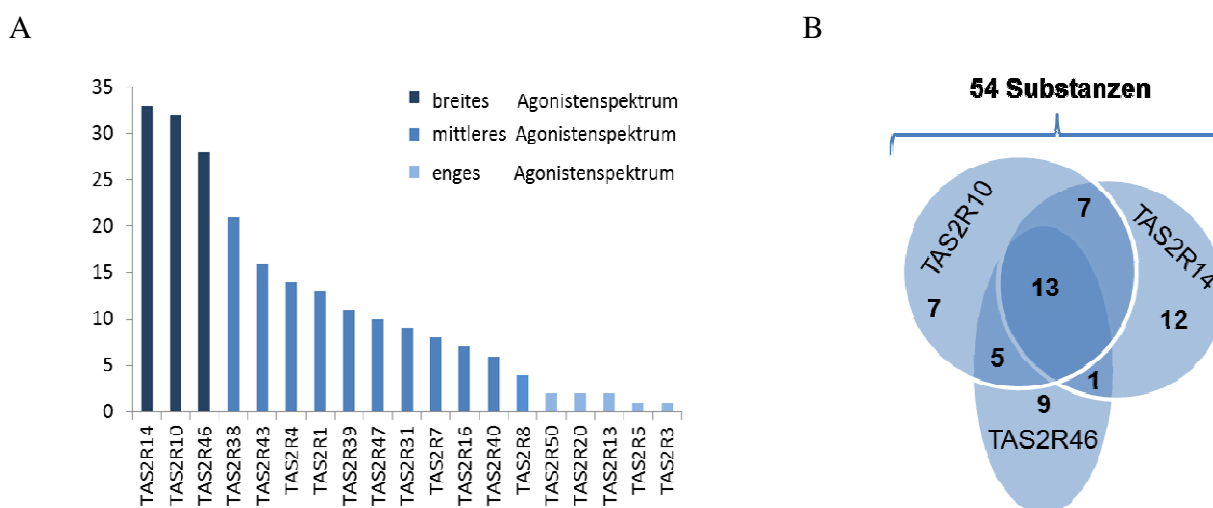


Abbildung 3: Aktivierung der TAS2R-Familie mit 82 von 104 getesteten Substanzen

A) Agonistenzahl der einzelnen TAS2Rs und B) 54 Substanzen aktivieren die drei TAS2Rs mit breitem Agonistenspektrum und zeigen ein teilweise überlappendes Agonistenspektrum (Behrens et al., 2004; Behrens et al., 2009; Brockhoff et al., 2007; Bufo et al., 2005; Bufo et al., 2002; Chandrashekar et al., 2000; Kim et al., 2003; Kuhn et al., 2004; Maehashi et al., 2008; Meyerhof et al., 2010; Pronin et al., 2004; Pronin et al., 2007; Sainz et al., 2007).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse hat gezeigt, dass es bittere Substanzen gibt, welche mehrere Rezeptoren aktivieren können, d.h. es existieren überlappende Agonistenspektren (Meyerhof et al., 2010). Des Weiteren fand man heraus, dass sich die Agonistenspektren der Rezeptoren in ihrer Größe stark unterscheiden (Abbildung 3A). So unterscheidet man Rezeptoren, die durch viele Agonisten aktivierbar sind (breites Agonistenspektrum), im Kontrast zu anderen Rezeptoren, bei denen nur wenige (mittleres Agonistenspektrum) oder sogar nur ein bzw. zwei Agonisten (enges Agonistenspektrum) bekannt sind.

Die Rezeptoren TAS2R10, -R14 und -R46 zeigen ein breit gefächertes Spektrum (Behrens et al., 2004; Brockhoff et al., 2007; Meyerhof et al., 2010). Nach der Publikation der 104 getesteten Substanzen durch Meyerhof und Kollegen, konnten davon 33 Substanzen den TAS2R14 aktivieren (Abbildung 3B). Im Zuge dieser Arbeit konnten noch weitere 24 TAS2R14-Agonisten identifiziert werden (siehe Kapitel: 3.2.1).

## 1.6 Bittersubstanzen: TAS2R14-Agonisten und ihre Wirkungen

Bittersubstanzen sind eine heterogene Gruppe von Stoffen, welche aus verschiedenen Substanzklassen stammen, darunter sind z. B.: Terpene, Alkaloide, Lactone, Bittersalze, Fettsäuren, Peptide, Amide und Ester, Flavonoide, Steroide und acetylierte Zucker (Belitz et al., 1985; Meyerhof et al., 2005a).

Der Rezeptor TAS2R14 zeigt ein breites Agonistenspektrum und kann als Generalist durch viele Substanzen mit unterschiedlicher chemischer Herkunft aktiviert werden. Unter den verschiedenen Agonisten konnte jedoch kein gemeinsames chemisches Merkmal gefunden werden (Behrens et al., 2004).

Zu den Agonisten gehören beispielsweise  $\alpha$ -Thujon (Monoterpen) und Pikrotoxinin (Sesquiterpenlacton), welche zu den ersten identifizierten Agonisten zählen. Beide Substanzen wirken antagonistisch auf den GABA-Rezeptor (Behrens et al., 2004). In geringen Konzentrationen kommt  $\alpha$ -Thujon unter anderem in den ätherischen Ölen von Thuja (Lebensbaum), Thymian, Rainfarn, Rosmarin, echtem Salbei und Wermut vor. Des Weiteren wird  $\alpha$ -Thujon die Eigenschaft der berauschenden Komponente in Absinth zugeschrieben (Hold et al., 2000; Baddar et al., 2011;). Eine neue Studie mit einer Diabetes anfälligen Rattenlinie (*Rattus norvegicus* UJ-1) konnte für  $\alpha$ -Thujon einen positiven Einfluss auf den krankhaft veränderten Cholesterin- und Triglycerid-Haushalt nachweisen (Baddar et al., 2011). Pikrotoxinin ist der giftige Bestandteil aus den Früchten der Scheinmyrte (*Anamirta cocculus*) und wurde in geringen Konzentrationen (0,001 g dreimal wöchentlich) als Bestandteil in



---

Pikrotoxin therapeutisch gegen Morbus Menièr, eine Erkrankung des Innenohrs, eingesetzt (Weikert et al., 2008).

Betrachtet man das große Agonistenspektrum des TAS2R14 fällt auf, dass viele medizinisch-wirksame Substanzen darunter zu finden sind. So auch die zwei Sesquiterpenlactone, Santonin und Parthenolid (Meyerhof et al., 2010; Born et al., 2013).

Santonin kann aus Wurmsamen (*Artemisia Santonica*) gewonnen werden und wurde in der Vergangenheit gegen Wurmbefall eingesetzt (Kahler, 1830; Dornblüth, 1927; Birladeanu, 2003). Neuere Studien diskutieren den Einsatz von Santonin-Derivaten in der Krebsbehandlung (Fujimoto et al 1979, Arabtes et al, 2009, Ferreira et al, 2013).

Parthenolid ist der Wirkstoff aus Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*) (Pareek et al., 2011). Die Untersuchungen an Ratten, bei denen durch Nitroglycerin Migränekopfschmerz ausgelöst wurde, zeigten eine reduzierte Produktion von NF-kappa-B bei der Gabe von Parthenolid (Tassorelli et al., 2005). NF-kappa-B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in Prozesse der Schmerzvermittlung und Entzündungsprozesse involviert ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Parthenolid inhibierende Wirkung auf das Wachstum von Krebszelllinien hat (Ross et al., 1999) und auf Leukämie-Stammzellen apoptotisch wirkt (Guzman et al., 2005).

Auffällig ist auch, dass sich noch weitere anti-entzündlich wirkende Substanzen, wie Humulon aus Bier und Flufenaminsäure, sich unter den TAS2R14-Agonisten befinden (Brown et al., 1970; Shapiro et al., 2001; Intelmann et al., 2009; Meyerhof et al., 2010).

Eine Reihe von TAS2R14-Agonisten stammt aus der chemischen Gruppe der Isoflavone. Zu diesen zählen z.B.: Genistein, Daidzein, Equol, Coumesrol, welche aus Sojabohnen isoliert werden können und ebenfalls anti-entzündliche Eigenschaften haben (Amin et al., 2007; Roland et al., 2011).

Eine weitere Substanz, H.g.12 von der Pflanze *Hoodia gordonii*, welche appetitzügelnde Eigenschaften haben soll, ist aus der chemischen Gruppe der Steroid-Glycoside (Le Neve et al., 2010).

Die Untersuchung des TAS2R14 Rezeptors ist gerade wegen der positiven pharmakologischen Wirkung diverser TAS2R14-Agonisten interessant, um eventuell in der Zukunft Bitterblocker zu entwickeln und somit die Akzeptanz für die Aufnahme dieser Substanzen als Medikament zu erhöhen.

## 1.7 Variationen der Rezeptorgene

Die kodierenden Regionen der 25 menschlichen Bitterrezeptorgene haben nur ein Exon und sind nicht durch Introns unterbrochen. Die Größe der kodierenden Sequenzen der TAS2R-Gene liegt zwischen 876 und 1017 Basenpaaren. Sie verteilen sich auf drei Chromosomen und liegen dort angeordnet in Clustern vor. Auf Chromosom 5 befindet sich das Gen für TAS2R1, auf Chromosom 7 sind die Gene für TAS2R16, -R3, -R4, -R5, -R38, -R39, -R40, -R60, -R41 und auf Chromosom 12 liegen die Gene für die Rezeptoren TAS2R7, -R8, -R9, -R10, -R13, -R14, -R50, -R20, -R19, -R31, -R46, -R43, -R45, -R30 und -R42 (Abbildung 4).

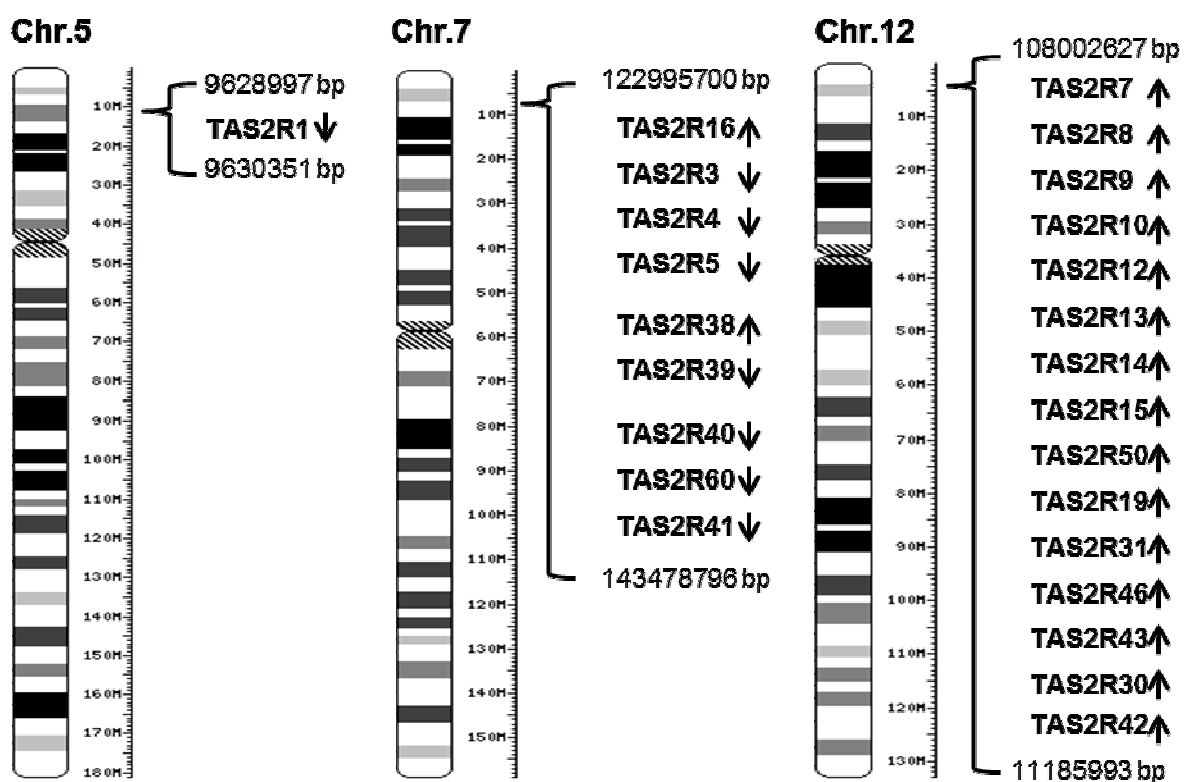


Abbildung 4: Lokalisation der 25 Bitterrezeptoren auf den Chromosomen 5, 7 und 12

Idiogramme der Chromosomen 5, 7 und 12 mit Reihenfolge und Ausrichtung (Pfeile) der TAS2R-Gene auf den jeweiligen Chromosomen im menschlichen Genom (Abbildung der Idiogramme und Information stammen von der NCBI-Datenbank)

Die Bitterrezeptoranzahl kann jedoch zwischen Menschen variieren (Pronin et al., 2007). Einige Menschen besitzen kein Gen für den Rezeptor TAS2R43 und andere kein Gen für den Rezeptor TAS2R45. Das Vorhandensein von funktionell unterschiedlichen Rezeptorvarianten führt ebenfalls zur Varianz der Bitter-Sensitivität (Kim et al., 2005).

Bei dem Rezeptor TAS2R38 fiel das Phänomen der Rezeptorvarianz zum ersten Mal auf. In der Arbeitsgruppe des Chemikers Arthur Fox beschwerte sich ein Kollege über den unangenehmen, bitteren Geschmack des Phenylthiocarbamid (PTC)-Staubs, während Fox nicht in der Lage war dies wahrzunehmen. Fox führte anschließend sensorische Tests mit vielen Probanden durch und zeigte, dass es keine Korrelation zwischen PTC-Wahrnehmungsunterschieden und Alter, Geschlecht oder ethnischer Herkunft gibt (Fox, 1932). Auffällig war, dass ein Teil der Probanden PTC schmecken konnte („Schmecker“) und andere PTC nur in sehr hohen Konzentrationen detektieren konnten („Nicht-Schmecker“). Erst nach der Entdeckung der TAS2R-Familie als Rezeptoren der Bitterwahrnehmung (Adler et al., 2000; Chandrashekar et al., 2000) gelang die Identifizierung der Bedeutung des TAS2R38-Gens und seiner Varianten (Kim et al., 2003; Bufe et al., 2005).

Das Phänomen wurde weltweit untersucht und es wurden die zwei häufigsten Haplotypen identifiziert: die „Schmecker“-Variante: Prolin49-Alanin262-Valin296 (PAV) und die „Nicht-Schmecker“-Variante mit Alanin49-Valin262-Isoleucin296 (AVI) (Kim et al., 2003; Wooding et al., 2004; Bufe et al., 2005; Wooding et al., 2006a).

Das Vorhandensein bestimmter Rezeptorvarianten verändert die Sensibilität für Bitterstoffe und beeinflusst so unsere Nahrungsvorlieben. So werden die Varianten des TAS2R16 (Hayes et al., 2011), TAS2R13 (Dotson et al., 2012) und TAS2R38 (Duffy et al., 2004; Wang et al., 2007) mit unterschiedlicher Präferenz für Alkoholkonsum in Verbindung gebracht.

Sensorische Studien zeigten, dass der Haploblock aus TAS2R3, -4 und -5 die Wahrnehmung von Bitterstoffen in Espresso und die Rezeptorvarianten des TAS2R19 die Erklärung der Geschmackswahrnehmung von Grapefruitsaft ermöglicht (Hayes et al., 2011).

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen der Wahrnehmung des bitteren Beigeschmacks der künstlichen Süßstoffe Saccharin und Acesulfam K. mit Rezeptorvarianten des TAS2R31 und -R43 hergestellt werden (Pronin et al., 2007; Roudnitzky et al., 2011). Die unterschiedliche geschmackliche Empfindung beim Verzehr von Artischocken hängt von der Bitterwahrnehmung der Substanz Grosheimin durch die unterschiedlichen Varianten der Bitterrezeptoren TAS2R43 und TAS2R46 ab (Roudnitzky et al., 2015).

Der Rezeptor TAS2R14 wird durch 954 Basenpaare kodiert und ist auf Chromosom 12 von der Position Base 10.939.207 bis 10.938.254 lokalisiert.

Innerhalb der kodierenden Sequenz des TAS2R14-Gens (Gen ID: 50840) gibt es 30 nicht-synonyme SNPs (Datenextraktion der SNP-Häufigkeiten des 1000-Genomprojekts von Roudnitzky et al., 2015, unpubliziert). Der häufigste nicht-synonyme SNPs in der Gesamtpopulation ist der rs16925868 (NP\_076411.1:p.Thr86Ala) mit ~2 %. Die

Gesamtpopulation der Studie setzt sich aus 5 Hauptgruppen (= Superpopulationen: Afrika, Amerika, Europa, Ostasien, Südasien) zusammen. Jede einzelne Hauptgruppe besteht aus Personen aus verschiedenen Regionen mit den genetischen Wurzeln der betreffenden Hauptgruppe. Innerhalb der Superpopulationen der Studie gibt es eine ungleichmäßige Verteilung. In der Amerika-Gruppe kommt der SNP rs16925868 zu 1 % vor, in der Europa- und Südasien-Gruppe zu 2 % und zu 4 % in der Afrika-Gruppe vor.

Alle anderen nsSNPs kommen in der Gesamtpopulation mit einer Häufigkeit von  $\leq 1\%$  vor. Jedoch innerhalb der Superpopulation gibt es einige nsSNPs mit höherem Vorkommen (rs79297986 (NP\_076411.1:p.Ile5Met), rs140545738 (NP\_076411.1:p.Cys67Ser), rs146833217 (NP\_076411.1:p.Asn87Tyr)  $\sim 2\%$  in Afrika und rs35804287 (NP\_076411.1:p.Leu201Phe)  $\sim 2\%$  in Europa). Des Weiteren gibt es den SNPs rs34789740 (NP\_076411.1:p.Arg174Ter (Fujikura, 2015), welcher eine Stoppmutation verursacht und in einer Subpopulation in Afrika mit 1 % vorkommt.

Betrachtet man die Häufigkeit der nicht-synonymen SNPs aller Bitterrezeptoren, so ist auffällig, dass die einzelnen Bitterrezeptoren zwischen 1 bis 7 nicht-synonyme SNPs mit mehr als 5 % in der Gesamtpopulation auftreten. Nur vier Bitterrezeptoren, darunter ist der TAS2R14, haben nur synonyme SNPs mit einer Häufigkeit über 5 %. Dieses liefert einen Hinweis auf die hohe Bedeutung des funktionellen Rezeptors TAS2R14.

## 1.8 Evolution der Bitterrezeptoren

Die Fähigkeit der Geschmackswahrnehmung konnte sowohl bei Invertebraten, z. B. bei Nematoden (*Caenorhabditis elegans*) und bei Insekten (*Drosophila melanogaster*), als auch bei Vertebraten, z. B. Säugetieren wie bei der Maus (*Mus musculus*) nachgewiesen werden. Die Fähigkeit der Geschmackswahrnehmung hat sich bei den Invertebraten und den Vertebraten separat entwickelt (Yarmolinsky et al., 2009).

Bei *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass sie Wasser mit toxischen Substanzen meiden, welche für den Menschen bitter schmecken (Hilliard et al., 2004). Auch Insekten lehnen Substanzen ab, welche für den Menschen bitter wahrgenommen werden, und bevorzugen Substanzen, die für den Menschen süß schmecken (Amrein et al., 2005).

Innerhalb der Vertebraten lässt sich die Eigenschaft der Bittergeschmackswahrnehmung auf gemeinsame Wurzeln zurückführen und wird somit immer über GPCRs vermittelt (Shi et al., 2006). Jedoch verfügen nicht alle Vertebraten über funktionelle Rezeptoren für die Wahrnehmung von Süß, Bitter und Umami. Zebrafinken (*Taeniopygia guttata*), Krallenfröschen (*Xenopus tropicalis*), Hühnern (*Gallus gallus domesticus*),

Vampirfledermäusen (*Desmodus rotundus*) und Katzen (*Felidae spec.*) fehlt ein funktionelles Gen für die Süßrezeptoruntereinheit Tas1r2 (=T1R2) (Li et al., 2005; Shi et al., 2006, 2009; Zhao et al., 2010). Der Zebrafisch (*Danio rerio*) hat zwar ein funktionelles Rezeptordimer Tas1r2/3, kann damit aber keine Süßstoffe wahrnehmen, sondern es wird das Umamirezeptordimer Tas1r1/3 durch Aminosäuren aktiviert (Oike et al., 2007).

Der große Panda (*Ailuropoda melanoleuca*), Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*) und Fledermäuse (*Microchiroptera spec.*) haben keine Umamirezeptoruntereinheit Tas1r1 (Shi et al., 2006; Zhao et al., 2010).

Im Genom von Delfinen (*Delphinidae spec.*) konnte kein funktionelles Rezeptorgen für die Geschmacksrichtungen süß, umami und bitter gefunden werden (Feng et al., 2014; Jiang et al., 2012). Dies wurde auch durch Feng und Kollegen bestätigt, die Sequenzen von verschiedenen Walarten verglichen haben. Sie zeigten, dass einige Bartenwale an der Basis des Stammbaumes noch einen funktionellen Bitterrezeptor besitzen, und konnten den Verlust von funktionellen Bitterrezeptoren innerhalb der Verwandtschaftslinie zeigen (Feng et al., 2014).

Die Arbeit von Zhao und Kollegen lässt vermuten, dass auch bei Pinguinen die Eigenschaft süß, umami und bitter zu schmecken im Zuge der Besiedlung der Antarktis verloren ging (Zhao et al., 2015).

Untersuchungen mit verschiedenen Affenarten, Schimpansen (*Pan spec.*), Gorilla (*Gorilla gorilla*), Orang-Utan (*Pongo spec.*) und Gibbons (*Hylobates spec.*) zeigten, dass sie wie der Mensch individuell unterschiedlich gut oder schlecht PTC schmecken können (Fisher, 1939; Fox, 1932; Wooding, 2006b). Dabei stellte sich heraus, dass das "Nicht-Schmecker"- und "Schmecker"-Allel mit nahezu gleicher Häufigkeit vorkommt. Eine neuere Studie zeigt, dass dieser Effekt evolutionär unabhängig entstanden sein muss (Wooding et al., 2006a). Da der Vergleich der Sequenz des homologen TAS2R38-Alleles von Schimpansen und Menschen artspezifische SNPs zeigten. Dies konnte auch in den Triplets, welche entscheidend für die Schmecker (TAS2R38 (PAV)) und Nicht-Schmecker Varianten (TAS2R38 (AVI)) sind, nachgewiesen werden.

Hayakawa zeigte sogar, dass innerhalb von 4 Schimpansenunterarten aus verschiedenen tropischen Bereichen in Afrika das Haplotypenvorkommen bzw. die Haplotypenhäufigkeit der Gene TAS2R38, -R41, -R46 und -R60 äußerst unterschiedlich verteilt ist, welches sich vermutlich auf das unterschiedliche Nahrungsangebot zurück führen lässt (Hayakawa et al., 2012). Im Jahr 2010 wurden japanische Makaken (*Macaca Fuscata*) und Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) auf ihre TAS2R38-Gensequenz untersucht (Suzuki et al., 2010). Das Ergebnis liefert Hinweise, dass auch hier die Unterschiede der TAS2R38-Varianten ("Nicht-Schmecker"- und "Schmecker"-Allel) erst nach der Aufspaltung der Makakenarten unabhängig entstanden sind.

Auch bei den Makaken entstand die „Nicht-Schmecker“-Variante durch den Verlust des Startcodons, wodurch kein funktioneller TAS2R38-Rezeptor exprimiert werden kann (Suzuki-Hashido et al., 2015).

Vergleicht man Vertebraten mit funktionellen Bitterrezeptoren untereinander, so ist auffällig, dass die Zahl der Bitterrezeptoren stark variiert. Ein Vertreter mit wenigen Bitterrezeptoren ist das Haushuhn mit drei TAS2Rs (Behrens et al., 2014). Der Frosch hingegen hat mit 54 Rezeptoren eine hohe Anzahl. Diese unterschiedliche Anzahl wird teilweise durch unterschiedlich große Agonistenspektren der einzelnen Rezeptoren ausgeglichen (Behrens et al., 2014) und scheint der Lebensweise angepasst zu sein (Li et al., 2014).

## 1.9 Einordnung der Bitterrezeptoren

Bitterrezeptoren gehören zu der Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) teilt man nach dem GRAFS-System in 5 Hauptgruppen ein: (1) Glutamat-, (2) Rhodopsin-, (3), Adhesion-, (4) Frizzled/Taste 2-, zu denen die Bitterrezeptoren gehören, und (5) Secretin-Rezeptorfamilie (Fredriksson et al., 2003).

Die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeichnen sich durch das gemeinsame Merkmal der sieben Transmembranhelices aus, welche durch drei extrazelluläre Schleifen und drei intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind.

Des Weiteren dienen diese Rezeptoren der Informationsweiterleitung von einem extrazellulären Signal über Agonisten zu einer internen Signalweiterleitung (Nygaard et al., 2009). Dabei reagiert die Zelle adäquat auf äußere Umstände ohne das Signalmolekül selbst, potentiell eine toxische Substanz, ins Zellinnere aufzunehmen. Eine Besonderheit existiert beim Rhodopsin-Rezeptor, bei dem nur ein Agonist, das Retinal, kovalent an den Rezeptor gebunden ist. Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt durch eine Änderung der Konformation des Retinals durch ein Photon (Ashmore et al., 1981).

Sowohl Rhodopsin, als auch der  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptor, zwei funktionell bedeutsamen GPCRs, wurden bereits 1986 kloniert (Dixon et al., 1986) und die Kristallstruktur analysiert (Cherezov et al., 2007; Palczewski et al., 2000; Rasmussen et al., 2007; Rasmussen et al., 2011; Salom et al., 2006; Warne et al., 2008). Inzwischen wurden weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren kristallographisch untersucht (siehe Anhang: Tabelle ), jedoch waren bis jetzt keine Geschmacksrezeptoren darunter. Daher basiert die Erstellung eines Homologiemodells für die TAS2R-Familie auf den Daten der Kristallstrukturen von anderen GPCRs aus der Rhodopsin-Familie.

## 1.10 Identifikation der interagierenden Aminosäuren in den Bindungstaschen

Welche Bitterstoffe von einem Rezeptor erkannt werden können, hängt einerseits von der Architektur der Bindungstasche ab (Brockhoff et al., 2010) und andererseits von der Gestalt der extrazellulären Schleifen, welche entscheidend für den Zugang der Bittersubstanzen in die Bindungstasche sind (Pronin et al., 2004; Sandal et al., 2015).

Anfang der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts wurden die ersten Punktmutagenesen mit anschließenden funktionellen Untersuchungen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durchgeführt. Im Fokus lagen die Charakterisierungen der Bindungstaschen, um Rückschlüsse auf das Interaktionspotential einzelner Substanzen zu treffen. Diese Ergebnisse wurden von mir in der Tabelle 1 zusammen getragen und teilweise durch die Angabe der Ballesteros-Weinstein-Nr. (Kapitel: 2.6) von mir ergänzt. Betrachtet man die identifizierten Position von Bindungstaschen, so ist auffällig, dass alle zur extrazellulären Seite gerichtet, im oberen Drittel der Rezeptoren liegen und die homologe Positionen **7.39** in allen aufgeführten Rezeptoren in Tabelle 1 wichtige Interaktionenstelle mit ihren Agonisten darstellen (Brockhoff et al., 2010; Slack et al., 2010; Born et al., 2013).

Tabelle 1: Zusammenstellung von veröffentlichten GPCR-Bindungstaschenanalysen

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit Aminosäurepositionen der jeweiligen Bindungstasche mit Angabe der Ballesteros-Weinstein-Nr. (Kapitel: 2.6)

Rezeptor	Identifizierte Positionen der Agonisteninteraktion	Referenz
$\beta$ 1-adrenerger Rezeptor (ADR $\beta$ 1)	<b>D121</b> <sup>3.32</sup> , <b>S211</b> <sup>5.42</sup> , <b>S215</b> <sup>5.46</sup> , <b>F325</b> <sup>7.35</sup> , <b>N329</b> <sup>7.39</sup> ,	(Warne et al., 2008)
$\beta$ 2-adrenergen Rezeptor	<b>D113</b> <sup>3.32</sup> , <b>V114</b> <sup>3.33</sup> , <b>S203</b> <sup>5.39</sup> , <b>S204</b> <sup>5.43</sup> , <b>S207</b> <sup>5.46</sup> , <b>N293</b> <sup>6.55</sup> , <b>Y308</b> <sup>7.35</sup> , <b>N312</b> <sup>7.39</sup>	(Guan et al., 1992; Liapakis et al., 2000; Rosenbaum et al., 2007; Strader et al., 1989; Strader et al., 1987; Suryanarayana et al., 1993)
Serotonin-Rezeptor 5-HT <sub>1A</sub> (= 5-Hydroxytryptamin)	<b>N385</b> <sup>7.39</sup>	(Guan et al., 1992; Kuipers et al., 1997)
Serotonin-Rezeptor 5-HT <sub>1B</sub>	<b>T355</b> <sup>7.39</sup>	(Brockhoff et al., 2010; Oksenberg et al., 1992)
Serotonin-Rezeptor 5-HT <sub>2A</sub>	<b>S159</b> <sup>3.36</sup>	(Almaula et al., 1996)

Weiterführung der Tabelle 1: Ausschnitt der GPCR-Bindungstaschenanalysen

<b>Rezeptor</b>	<b>Identifizierte Positionen der Agonisteninteraktion</b>	<b>Referenz</b>
Cholecystokinin-B/Gastrin-Rezeptor	<b>H376</b> <sup>7.39</sup>	(Kopin et al., 1995)
A2A-Adenosin Rezeptor	<b>T88</b> <sup>3.36</sup> , <b>H250</b> <sup>6.52</sup> , <b>N253</b> <sup>6.55</sup> , <b>I274</b> <sup>7.39</sup> , <b>S277</b> <sup>7.42</sup> , <b>H278</b> <sup>7.43</sup>	(Xu et al., 2011)
Dopamin D3	<b>D110</b> <sup>3.32</sup> , <b>F164</b> <sup>3.28</sup> , <b>V165</b> <sup>3.29</sup> , <b>S168</b> <sup>4.57</sup> , <b>Y373</b> <sup>7.43</sup>	(Carlsson et al., 2011)
M1 Muscarinic Rezeptor (CHRM1)	<b>D105</b> <sup>3.32</sup> , <b>Y 381</b> <sup>6.51</sup> , <b>Y404</b> <sup>7.39</sup> , <b>Y408</b> <sup>7.43</sup>	(Peng et al., 2006)
M2 Muscarinic Rezeptor (CHRM2)	<b>D103</b> <sup>3.32</sup> , <b>T187</b> <sup>5.39</sup> , <b>T190</b> <sup>5.42</sup> , <b>Y403</b> <sup>6.51</sup> , <b>N404</b> <sup>6.52</sup> , <b>W422</b> <sup>7.35</sup>	(Haga et al., 2012)
Purinorezeptor P2U	<b>K107</b> <sup>3.26</sup> , <b>R110</b> <sup>3.29</sup> , <b>H262</b> <sup>6.52</sup> , <b>R265</b> <sup>6.55</sup> , <b>R292</b> <sup>7.39</sup>	(Brockhoff et al., 2010; Erb et al., 1995)
Purinorezeptor P2Y1	<b>R128</b> <sup>3.29</sup> , <b>R310</b> <sup>7.39</sup> , <b>S314</b> <sup>7.43</sup>	(Jiang et al., 1997)
Protease-aktivierender Rezeptor 1 (PAR1)	<b>H255</b> , <b>F271</b> <sup>5.39</sup> , <b>F274</b> <sup>5.42</sup> , <b>F278</b> <sup>5.46</sup> , <b>Y337</b> <sup>6.59</sup> , <b>Y353</b> <sup>7.35</sup>	(Zhang et al., 2012)
Nociceptin Rezeptor	<b>N110</b> <sup>2.63</sup> , <b>D130</b> <sup>3.32</sup> , <b>Y131</b> <sup>3.33</sup> , <b>M134</b> <sup>3.36</sup> , <b>K227</b> <sup>5.39</sup> , <b>Q280</b> <sup>6.52</sup> , <b>T305</b> <sup>7.39</sup> , <b>Y309</b> <sup>7.43</sup>	(Thompson et al., 2012)
Kappa-Opioid Rezeptor	<b>D138</b> <sup>3.32</sup> , <b>Y139</b> <sup>3.33</sup> , <b>I294</b> <sup>6.55</sup> , <b>E297</b> <sup>6.58</sup> , <b>Y312</b> <sup>7.35</sup>	(Wu et al., 2012)
Chemokin CXCR4	<b>D97</b> <sup>2.63</sup> , <b>D262</b> <sup>6.58</sup> , <b>D276</b> <sup>7.32</sup> , <b>E288</b> <sup>7.39</sup>	(Qin et al., 2015)
C-C-Chemokin Rezeptor 5 (CCR5)	<b>D97</b> <sup>2.63</sup> , <b>H113</b> <sup>3.29</sup> , <b>D171</b> <sup>4.60</sup> , <b>E288</b> <sup>7.39</sup>	(Wu et al., 2010)



Pronin und Kollegen führten die ersten Punktmutationsanalysen an TAS2R-Familie durch. Dabei zeigten sie die Bedeutung der Position **N92**<sup>3.36</sup> bei den Bitterrezeptoren TAS2R31 (=h64) und TAS2R43 (=h61) (Pronin et al., 2004).

Im TAS2R1 wurden die Aminosäuren **N24**<sup>1.50</sup>, **R55**<sup>2.54</sup>, **N66**<sup>2.65</sup>, **N89**<sup>3.45</sup>, **L197**<sup>5.50</sup>, **S200**<sup>5.53</sup> und **L201**<sup>5.54</sup> als wichtige Positionen der Bindungstaschen identifiziert (Upadhyaya et al., 2010; Singh et al., 2011).

Der TAS2R16 ist ein Spezialist für die  $\beta$ -D-Glucopyranosid-Erkennung von beispielsweise D-(-)-Salicin (Bufe et al., 2002; Sakurai et al., 2010). Sakurai und Kollegen konnten mit einem *In-silico*-Modell die Bindungstaschenregion eingrenzen und die direkte Interaktion von drei Aminosäuren, **E86**<sup>3.33</sup>, **W94**<sup>3.41</sup> und **H181**<sup>5.43</sup> mit D-(-)-Salicin, nachgewiesen.

Der TAS2R38 wird ausschließlich durch Thiocyanat-Verbindungen (N-C=S) aktiviert und kann daher als Spezialist angesehen werden (Bufe et al., 2005). Zur Interaktion werden die Position **N103**<sup>3.36</sup>, **F197**<sup>5.42</sup>, **W201**<sup>5.46</sup> und **F264**<sup>6.56</sup> benötigt (Biarnes et al., 2010; Marchiori et al., 2013). Bei der Untersuchung des TAS2R46 konnten **N92**<sup>3.36</sup>, **Y241**<sup>6.50</sup>, **F269**<sup>7.43</sup>, **E265**<sup>7.39</sup> und **A268**<sup>7.42</sup> als Interaktionspositionen der Bindungstasche identifiziert werden (Brockhoff et al., 2010). Des Weiteren gelang Brockhoff *et al.* die Übertragung des Agonistenspektrums des TAS2R46 auf den nah verwandten TAS2R31 durch den Austausch der Aminosäuren der Positionen **E265K**<sup>7.39</sup> und **A268R**<sup>7.42</sup>.

Die Bindungstasche des TAS2R10 ist optimal an die Erkennung vieler Agonisten angepasst. Dies geht mit der Reduktion der Affinität für einzelne Agonisten einher und der TAS2R10 stellt somit einen typischen „Generalistenrezeptor“ dar (Born et al., 2013). Wichtige Interaktionspositionen im TAS2R10 sind **S85**<sup>3.29</sup> und **Q175**<sup>5.40</sup>.

Bis jetzt liegen die Aminosäuren, die an der Bindung beteiligt sind, in allen untersuchten Rezeptoren in dem gleichen Rezeptorbereich. Jedoch kann die Bindungsweise verschiedener Rezeptoren unterschiedlich sein, so liegt beispielsweise Strychnin in den Rezeptoren TAS2R10 und -R46 gemäß des erstellten Rezeptormodells in unterschiedlicher Ausrichtung in den Rezeptoren (Born et al., 2013). Ob diese Beobachtung auch für den TAS2R14 und andere TAS2R-Familie mit gleichen Agonisten zutrifft, lässt sich daraus jedoch nicht schlussfolgern.

## 1.11 Zielstellung dieser Arbeit

Die Bitterwahrnehmung wird beim Menschen über 25 Bitterrezeptoren realisiert und hat mit weiteren Faktoren einen Einfluss auf unsere Nahrungsvorlieben. Die Überprüfung der Aktivierungseigenschaften von 104 Substanzen auf diese Rezeptoren ergab einen Überblick bezüglich deren Agonistenspektrum (Meyerhof 2010). Dabei zeigten die drei Rezeptoren TAS2R10, -R14 und -R46 das breiteste Agonistenspektrum.

Obwohl inzwischen eine Vielzahl von Rezeptoren hinsichtlich ihrer Struktur-Wirkungsbeziehung charakterisiert wurden (TAS2R1 (Singh et al., 2011; Upadhyaya et al., 2010), TAS2R16 (Sakurai et al., 2010), TAS2R31 (=h64) und TASR43 (=h61) (Pronin et al., 2004) TAS2R38 (Biarnes et al., 2010; Marchiori et al., 2013), TAS2R10 (Born et al., 2013) und -R46 (Brockhoff et al., 2010)), reichen die gesammelten Erkenntnisse nicht aus, um eine Vielzahl von Fragen zu beantworten. Vorhersagen für Agonisten einzelner Rezeptoren wie beispielsweise den TAS2R14 können immer noch nicht zielsicher getroffen werden.

Des Weiteren spielt der Rezeptor TAS2R14 eine große Rolle bei der Wahrnehmung von bitteren, sekundären Pflanzenstoffen aus Gemüse, welche eine gesundheitsfördernde Wirkung besitzen. Auch viele Arzneistoffe aktivieren den Rezeptor TAS2R14 und rufen ein angeborenes Ablehnungsverhalten. Dies spielt insbesondere bei Kleinkindern, die nicht auf verkapselte Medikamente zurückgreifen können, eine besondere Rolle. Begründet auf diese Tatsache, ist der TAS2R14 ein wichtiges Ziel für die Entwicklung von Antagonisten, die einen bitteren Geschmack maskieren könnten („Bitterblocker“).

Die erste ausführliche Untersuchung des TAS2R14 ließ keine Rückschlüsse auf gemeinsame, chemische Merkmale von TAS2R14-Agonisten zu (Behrens et al., 2004). Hierdurch ist eine Vorhersage von sowohl Agonisten als auch Antagonisten erschwert.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Bindungstasche des Rezeptors TAS2R14 und die Analyse der pharmakologischen Eigenschaften der Agonisten. Diese Erkenntnisse könnten die Grundlage für gezielte Veränderung von gesundheitsfördernden Wirkstoffen darstellen, welche den Bitterrezeptor TAS2R14 nicht mehr aktivieren und somit die Akzeptanz der Konsumenten erhöhen, ohne jedoch die positive Wirkung zu verlieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Produktbeschreibung	Produktname	Hersteller
Abzug mit Sicherheits- unterschränken	Tischabzug	Waldner Firmengruppe
Agarosegelelektrophorese Zubehör	Horizon 58 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra
Netzgerät für Agarosegelelektrophorese	PowerPac 300	Biorad
Fluorometrisches Plattenlesegerät	FLIPR Tetra High Throughput Screening System	Cellular Molecular Devices
Geldokumentationssystem	Gene Genius Bio imaging system	Syngene
Hybridisierungssofen	Hybridisierungssofen-perfect blot	peqLab
Inkubator	Hera cell	Heraeus
Magnetrührer	RH basic 2	IKA
Mikroskop (Zellkultur)	Telaval 31 inverted microscope	Zeiss
Mikroskop	Konfokales Mikroskop: Leica TCS SP2	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Mikrowelle	Mikrowelle MW17M70G	MDA
pH-Meter	Hi 221 pH/ mV/°C Bench Meters with Calibration Check	HANNA instruments
Photometer	Colibri-Mikrovolumen-Spektrophotometer für DNA, RNA und Proteine	Titertek / Berthold
Pipettierhilfe	Vacuboy	IBS Integra Biosciences
Plattenwaschgerät	Microplate Washer ELx50	Bio Tek Instruments
Schüttler	Bench-top-shakers TR -250	Infors HT
Schüttler	Press-to-mix	Snijders
Schüttler	Reagenzglasschüttler -Vortex Mixer	VWK
Schüttler	Vortex-Genie-2	Scientific Industries
Sterilbank	MSC-II-48 Biological Safety Cabinets	Thermo scientific
Thermocycler	T3000 Thermocycler	Biometra
Thermoblock	Thermomixer kompakt	Eppendorf
Transilluminator	Transilluminator 4000	Stratagene
Waage	Atilon Analysewaage	Sartorius
Waage	Sartorius research	Sartorius
Wasserbad	GFL-1083 Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
Zentrifugen / Rotoren (Volumen der Zentrifugenbehältnisse)	Centrifuge 5804 R, Rotor: F34-6-38 (50 ml-Gefäße)	Eppendorf
	Centrifuge 5417 R, Rotor: F45-30-11 (2 ml-Gefäße)	Eppendorf
	J2-MI Centrifuge, Rotor: JA-14 (250 ml-Becher)	Beckmann

## 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck
Agar-Agar (Select Agar®, powder)	Invitrogen / Life technologies
Agarose SERVA Wide Range	SERVA
Caseinhydrolysat, bakteriologisch	Roth
Borsäure	Merck
dNTP Set 4 x 25 µmol	Fermentas / Thermo Scientific
DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth
D-(+)-Glucose	Sigma
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose)	Gibco / Life technologies
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethidiumbromidlösung 1%	Roth
Ethanol (Absolut für Analyse)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Fötale Kälberserum	Biochrom
Fluo-4-AM, cell permeant	Molecular Probes/Life technologies
G-418-Sulfat	Calbiochem
L-Glutamin	Biochrom
Glycerol	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt, Pulver, für die Bakteriologie	Roth
Hepes	Sigma-Aldrich
Immersol 518N	Zeiss
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen / Life technologies
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid-Plätzchen	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Poly-D-Lysinhydrobromid	Sigma-Aldrich
Probenecid	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Merck
Somatostatin-14	Bachem
SOC-Medium	Invitrogen / Life technologies
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth
Trypsin	Gibco / Life technologies

## 2.1.3 Standardpuffer und -lösungen

HEPES-Puffer	1M HEPES, NaOH-Plätzchen (pH 7,4)
PBS	140 mM NaCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2,7 mM KCl; 1,76 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4)
TAE-Puffer	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1mM EDTA (pH 8,0)
Trypsinlösung	0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS; pH 7,4

serumhaltiges DMEM-Zellkulturmedium: 500ml DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin

**2.1.4 Kits**

JET quick Plasmid Miniprep Spin-Kit	Genomed GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit (50)	Qiagen
Buffer PB	Qiagen
NucleoBond PC 500, MIDI	Macherey-Nagel

**2.1.5 DNA-Marker / Leitern**

Gene Ruler™ 100bp DNA Leiter	Fermentas / Thermo Scientific
6x Loading Dye Solution	Fermentas / Thermo Scientific

**2.1.6 Enzyme / Enzym Puffer**

Pfu Ultra DNA-Polymerase 100 U	Stratagene
10x Pfu-Puffer	Stratagene
EcoR I 5000 U (10 U / $\mu$ l)	Fermentas / Thermo Scientific
Not I 1500 U (10 U / $\mu$ l)	Fermentas / Thermo Scientific
Hind III 5000 U (10 U / $\mu$ l)	Fermentas / Thermo Scientific
10x Buffer O (für EcoR I, Not I)	Fermentas / Thermo Scientific
10x Buffer R (für Hind III)	Fermentas / Thermo Scientific
SAP (Shrimp-Alkaline-Phosphatase) Enzym (1U/ $\mu$ l)	Amersham, Freiburg
10x SAP Reaction Buffer	Amersham, Freiburg
T4 DNA Ligase (400 U / $\mu$ l)	New England BioLabs
10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England BioLabs

**2.1.7 Oligonukleotide**

Die Mutagenese-Primer wurden bei Eurofins bestellt. Angaben zu Primernamen, -sequenz und -eigenschaften können dem Anhang entnommen werden (Anhang: 10.3, 10.4, 10.5 und 10.6).

**2.1.8 Geschmacksstoffe**

Die getesteten Substanzen wurden bei Sigma-Aldrich erworben oder durch unseren Kooperationspartner Rafik Karaman (College of Pharmacy / Al-Quds University, Palestine) synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

## 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Cryoröhrchen mit Innengewindedichtung	Roth
Handschuhe rotiprotect-Latex	Roth
Gewebekulturschalen UltraCruz mit Setzring, 100x20 mm	Santa Cruz Biotechnology
Deckgläschen 12mm Ø	VWR
Kulturröhrchen, Rundboden, zwei-Positionenbelüftungsstopfen	Greiner Bio-one
Objektträger Superfrost/Plus	Roth
PCR Tubes Strips 0,2 ml	Eppendorf
Petrischalen, 94/16mm, Standard, ohne Nocken, steril	Greiner Bio-One
Pipetten	Eppendorf
Eppendorf Research pro – Electronic Pipettes 100 +1200	Eppendorf
Transferpette	Brand
Pasteur Pipetten, ohne Wattestopfen	Roth
F1 Clip Tip-Pipetten	Thermo Scientific
Pipettenspitzen	
Standard Universal	Eppendorf
ep. T.I.P.S 50 -1250 µl	Th. Geyer
OMITIP 200µl	UL Plast
Safe seal-Tips professional	Biozym
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Greiner
Filterspitzen	Biozym
Pipettenspitzen, lose, PP, 50-1000 µl	Brand
Clip Tip Pipettenspitzen	Thermo Scientific
Reaktionsgefäße mit Sicherheitsverschluss ( 1,5 ml/2 ml)	Eppendorf
Roti-Tape-Markierbänder	Roth
Zellkulturtestplatten, 24 / 96 well	TPP
Zentrifugenröhrchen (15ml / 50ml)	TPP
UltraCruz Tissue Culture plate, 96 well,	Santa Cruz Biotechnologie
Schwarzer Rahmen & klarer, flacher Boden	

## 2.1.10 Software, Datenbanken und Online Programme

### Software

CorelDraw X3 Version13	Corel Corporation
CorelPhoto-Paint X3 Version13	Corel Corporation
Discovery Studio 3.5 Visualizer	Accelrys Software
End Note9 X6.0.1	Thomson Reuters
Gene snap 6.01.02	Syngene
ImageJ 1.47	National Institute of Health, USA
Leica confocal Software	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Maestro	Schrödinger, LLC
Microsoft Office Professional Plus 2010	Microsoft Corporation
PyMol 1.5.0.4	Schrödinger, LLC
ScreenWorks 3.1.14	Molecular Devices

Sigma Plot for Windows Version 11.0	Systat Software, Inc.
Statistics Software Package (SPSS) 20.0.0	IBM SPSS Statistics
Vector NTI Advance 11.5.1	Invitrogen / Life technologies™

### Datenbanken / Online Programme

<a href="https://ecom.mwgdna.com">https://ecom.mwgdna.com</a>	Primerbestellung, Sequenzierung
<a href="http://www.bioinformatics.org/">http://www.bioinformatics.org/</a>	Komplementär-Strangangabe (5'→3')
<a href="https://ncbi.nlm.nih.gov/">https://ncbi.nlm.nih.gov/</a>	NCBI (Gen- und Proteindatenbank, Alignmentstudien und Literaturrecherche)
<a href="https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/">https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/</a>	TCoffee (Aminosäure-Sequenzalignment)
<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/</a>	PSI-PRED Algorithmus-2D-Strukturanalyse
<a href="http://www.promega.com/">http://www.promega.com/</a>	Primer-Schmelztemperaturberechnung
<a href="http://www.promega.de/resources/tools/">http://www.promega.de/resources/tools/</a>	Molekulare Berechnungen
<a href="http://www.sigmaaldrich.com/">http://www.sigmaaldrich.com/</a>	Schmelztemperaturberechnung
<a href="http://www.1000genomes.org/">http://www.1000genomes.org/</a>	Informationen über SNPs
<a href="http://bitterdb.agri.huji.ac.il/">http://bitterdb.agri.huji.ac.il/</a>	BitterDB (Bittersubstanzen-Datenbank)
<a href="http://www.drugbank.ca/">http://www.drugbank.ca/</a>	DrugBank (Datenbank für Wirkstoffe)

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

Zur Untersuchung der Struktur- und Funktionsbeziehungen wurden gezielt Rezeptormodifikation mit der PCR-basierte Mutagenese (Fang et al., 1999) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial und Wildtypkontrolle wurden die sensitivsten und zugleich häufigsten TAS2R14- und TAS2R13-Varianten verwendet (Dotson et al., 2012; Meyerhof et al., 2010; Thalmann et al., 2013) (siehe Kapitel: 1.7, Anhang: 10.1).

Die Bitterrezeptoren TAS2R14 bzw. TAS2R13 wurden für die Analyse als Fusionsprotein mit einem N-terminalen sst3-Tag (45 Aminosäuren des Somatostatin Rezeptor 3 der Ratte (*Rattus norvegicus*)) und einem C-terminalen HSV-Epitop-Tag (11 AS des Glycoprotein-D-Proteins vom humanen Herpesvirus (*Herpes simplex virus*)) exprimiert (Sequenz siehe Anhang: 10.2 (Bufo et al., 2002)). Der sst3-Tag wurde als Export-Tag benötigt, damit der Rezeptor in die Zellmembran der heterologen Zellen (Kapitel: 2.4) in ausreichender Menge eingebaut wird. Der HSV-Epitop-Tag diente der Detektion des Fusionsproteins, um die Expression des Rezeptors und die Lokalisation mittels Antikörper nachweisen zu können (Kapitel: 2.5). Die DNA-Sequenz für das Fusionsprotein lag im Vektor pcDNA5FRT PM vor (Vektorkarte siehe Anhang: 10.2).

### 2.2.1 Mutagenese mittels PCR

Die Rezeptormodifikation erfolgte durch eine PCR-basierte Mutagenese (Fang et al., 1999). Dabei konnten sowohl einzelne Nukleotide ausgetauscht werden als auch ganze Bereiche des Rezeptors ausgetauscht werden.

Für den Austausch einzelner Nukleotide wurden die Mutageneseprimer so generiert, dass die gewünschte Veränderung in der Mitte der Primer lag und von mindestens 10 Basenpaaren zu beiden Seiten umgeben waren.

Zur Bestimmung der Schmelztemperatur wurde das Online-Programm „BioMath Calculators“ (<http://www.promega.com/techserv/tools/biomath/calc11.htm>) verwendet. Die tatsächliche Schmelztemperatur hängt von der Anzahl der eingefügten Mutationen ab. Ein Prozent Abweichung ( $\text{Abweichung [\%]} = \text{Zahl der zu ändernden Basen} * 100 / \text{Primerbasenzahl}$ ) entspricht einer 1-1,5 °C verringerter Schmelztemperatur. Die errechnete Schmelztemperatur sollte zwischen 60 bis 65 °C liegen. Die Synthese der Primerpaare erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics GmbH.

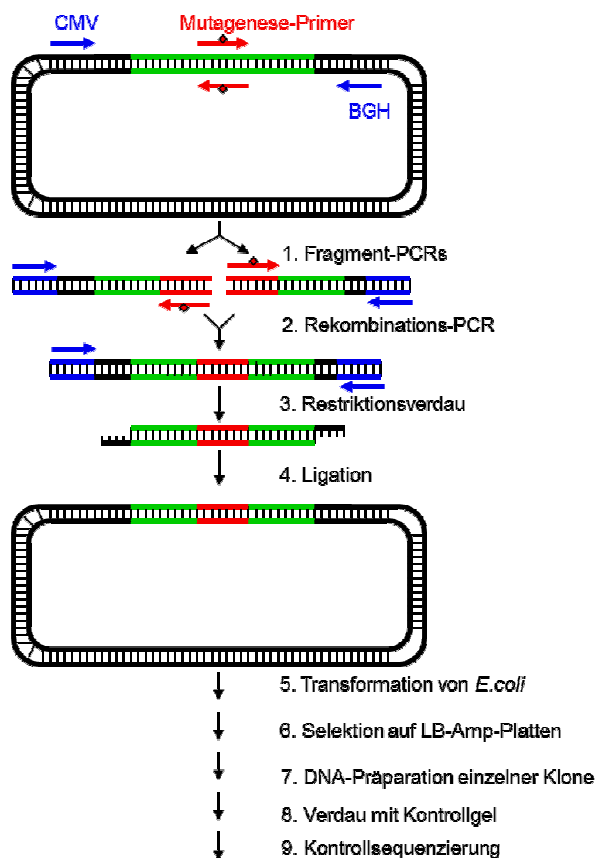


Abbildung 5: PCR-basierte Punktmutagenese

Ausgehend vom pcDNA5FRT PM-Vektor mit der DNA-Sequenz für das Fusionsprotein, wurden zwei Fragment-PCRs durchgeführt. Die entstandenen Fragmente wurden in der Rekombinations-PCR zu einem DNA-Fragment vereint, mit EcoR I + Not I bei TAS2R14 oder mit Hind III + Not I bei TAS2R13 verdaut und in einen dephosphorylierten Vektor ligiert. Anschließend wurden chemisch kompetente *E. coli* mit dem Vektor transformiert und über die Ampicillin-Resistenz selektiert (Bezugsquellen siehe Kapitel: 2.1.6 und 2.1.7).



Im ersten Schritt der Mutagenese wurden zwei Fragmente hergestellt (25µl-Ansätze Fragment-PCR, Bezugsquellen siehe Kapitel: 2.1.6 und 2.1.7). Das erste Fragment entstand bei der PCR mit dem CMV-forward -Vektorprimer und dem reverse-Mutageneseprimer. Das zweite Fragment wurde durch die Nutzung von forward-Mutageneseprimer und dem BGH-reverse-Vektorprimer hergestellt (Abbildung 5 und im Anhang: Tabelle 8 bis Tabelle 11). Die entstanden Fragmente wurden auf ein 1%-Agarose-Gel aufgetragen, die jeweilige Bande ausgeschnitten und per Gelextraktion mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Die Fragmentenden des PCR-Produkts, die durch die Mutagenese-Primer entstanden sind, sind komplementär zueinander und tragen die gewünschte Mutation. Diese beiden Fragmente wurden als Matrize bei der Rekombinations-PCR (25µl-Ansatz) eingesetzt und mit den Primern CMV-forward-Vektorprimer und BGH-reverse-Vektorprimer durchgeführt.

<b><u>Fragment-PCRs</u></b> (25µl Ansatz)	10 ng/25µl	Ausgangs-DNA	1. Denaturierung	5 min	95 °C
	0,8 mM	dNTP-Mix (2,5 mM pro dNTP)	2. Annealing	1 min	54 °C (BGH)
	1x	Pfu-Puffer	/ 61 °C (CMV)		
	3 Units	Pfu-DNA-Polymerase	3. Elongation	1,5 min	72 °C
	0,2 pmol	Mutageneseprimer	4. Denaturierung	0,5 min	95 °C
	0,2 pmol	Vektor-Primer	5. Annealing	5 min	54 °C (BGH)
			/ 61 °C (CMV)		
		6. Elongation	10 min	72 °C	
		7. Pause		∞ 4 °C	
		Zykluswiederholung Schritt 2-3 15x			
<b><u>Rekombinations-PCR</u></b> (25µl Ansatz)	10 ng/25µl	Fragment-DNA	1. Denaturierung	5 min	95 °C
	0,8 mM	dNTP-Mix (2,5 mM pro dNTP)	2. Annealing	2 min	61 °C
	1x	Pfu-Puffer	3. Elongation	3 min	72 °C
	3 Units	Pfu-DNA-Polymerase	4. Denaturierung	0,5 min	95 °C
	0,2 pmol	forward-CMV-Primer	5. Annealing	1 min	56 °C
	0,2 pmol	reverse-BGH-Primer	6. Elongation	3 min	72 °C
			7. Denaturierung	0,5 min	95 °C
			8. Annealing	5 min	56 °C
			9. Elongation	10 min	72 °C
			10. Pause	∞	4 °C
		Zykluswiederholung Schritt 2-4 4x und Schritte 5-7 15x			

## 2.2.2 Vorbereitung des punktmutierten Rezeptorfragments

Das PCR-Produkt der Rekombinations-PCR wurde anschließend mit zwei Enzymen geschnitten, so dass an den Enden 5'-Überhänge entstanden sind, um die gerichtete Ligation des Inserts in einen mit den entsprechenden Restriktionsenzymen linearisierten, dephosphorylierten Vektor (siehe Kapitel: 2.2.3) zu ermöglichen (Bezugsquellen siehe Kapitel: 2.1.6 und 2.1.7).

Im Falle des TAS2R14 wurden die Restriktionsenzyme EcoR I und Not I (Fermentas / Thermo Scientific) verwendet. Bei dem Rezeptor TAS2R13 konnte EcoR I nicht zum Einsatz kommen, da der Rezeptor eine interne EcoR I-Schnittstelle aufweist. Daher wurde beim TAS2R13 Hind III (Fermentas / Thermo Scientific) verwendet. Das verdaute Produkt wurde über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt und mittels Gelextraktion mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen) isoliert.

### TAS2R13-zweistufiger Verdau

#### 30µl-Ansatz:

25µl PCR-Produkt

25 U Hind III

1x Puffer R

→ Inkubation:

2h bei 37°C

#### 50µl-Ansatz:

30µl des Hind III-Verdaus

25 U Not I

1x Buffer O

→ Inkubation:

2h bei 37°C

### TAS2R14-Verdau

#### 30µl-Ansatz:

25µl PCR-Produkt

10 U EcoR I

20 U Not I

1x Buffer O

→ Inkubation: 3 – 5h bei 37°C

## 2.2.3 Liniarisierung und Dephosphorylierung des Vektors

Um das verdaute, linearisierte PCR-Produkt (siehe Abschnitt 2.2.2) in den Vektor ligieren zu können, musste der Vektor mit Restriktionsenzymen geschnitten und dephosphoryliert werden.

Der Vektor pcDNA5 pM FRT wurde durch die Restriktionsenzyme Hind III und Not I (für das TAS2R13-Fragment) oder mit EcoR I und Not I (für TAS2R14) geschnitten. Der Verdau wurde auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels Gelextraktion mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Quiagen) aufgereinigt. Der geschnittene Vektor wurde mit Alkalischer Phosphatase aus Garnelen (SAP = Shrimp Alkaline Phosphatase) für 45 min bei 37°C dephosphoryliert, um die Religationsrate des Vektors gering zu halten (Hoseini et al., 2015), und anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert, um das SAP-Enzym zu deaktivieren.

**Dephosphorylierung (40µl-Ansatz)**

40 ng linearisierter Vektor

4 U SAP-Enzym

1x SAP-Reaktionspuffer

→ Inkubation: 45 min bei 37°C

→ Inkubation: 10 min bei 65°C

**2.2.4 Ligation**

Das vorbereitete Insert wurde anschließend mit Restriktionsenzymen behandelten, dephosphorylierten Vektor pcDNA5 pM FRT bei 17°C über Nacht ligiert.

**Ligation (10µl-Ansatz)**

40-50 ng Insert

15 ng geschnittener, dephosphorylierter Vektor

→ Inkubation: 5 min bei 45°C → auf Eis weiter pipettieren

400 U T4-DNA-Ligase (400 U/µl)

1x T4-DNA-Ligase-Reaktionspuffer

→ Inkubation: über Nacht bei 17 °C (oder 3 h bei RT)

**2.2.5 Klonierung**

Nach der Ligation wurden chemisch kompetente Zellen mit der Plasmid-DNA transformiert, um sie zu vervielfältigen. Zur Replikation der Plasmid-DNA wurden kompetente Zellen One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli (Invitrogen / Life technologies) oder BIOBlue 10<sup>9</sup> Chemically Competent Cells (Bioline) verwendet. Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen auf Eis angetaut, 2,5 µl Ligationsansatz dazu gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 30 Sekunden bei 42°C auf dem Thermoblock erhitzt und für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Nach der Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Zellen eine Stunde bei 37°C geschwenkt und anschließend auf LB-Amp-Platten (1% NaCl (w/v), 1% Select Pepton (w/v) und 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1,5% (w/v) Agar, 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die LB-Amp-Platten mit den ausgestrichenen Bakterien wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C auf dem Deckel liegend kultiviert. Durch die Selektion mit 100 µg/ml Ampicillin wurde das Wachstum von Bakterien ohne Plasmid verhindert. Anschließend wurden 4 Klone von der Platte in 6 ml ampicillinhaltigem LB-Medium (Rezept wie LB-Amp-Platten nur ohne Agar) auf dem Schüttler über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Plasmid-DNA-Extraktion wurde aus 4 ml Kulturlösung mittels JET quick Plasmid Miniprep

Spin-Kit isoliert, welches nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Aufreinigung über eine Silikatmembran beruht (2 ml der Kulturlösung wurden bei 4 °C aufgehoben).

### 2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde das Colibri-Mikrovolumen-Spektrophotometer bei der Absorption von 260 nm verwendet. Um die Reinheit der DNA zu prüfen, wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Bei einer proteinfreien Nukleinsäurelösung beträgt der Quotient der Absorption 260nm /Absorption 280nm 1,8 – 2,0 (Mülhardt, 2006).

### 2.2.7 Kontrollverdau und Sequenzierung

Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zunächst einem Kontrollverdau unterzogen und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, um Klone mit religiertem Vektor ohne Insert ausschließen zu können. Klone mit erwartetem Bandenmuster wurden zur Sequenzierung zur Firma Eurofins Genomics GmbH versandt, um die Plasmid-DNA der verschiedenen Bakterienklone mit der korrekten, mutationstragenden Sequenz zu identifizieren. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm VectorNTI Advance 11.5.1 (2011 Invitrogen / Life technologies).

#### Kontrollverdau (10 µl-Ansatz)

100 ng DNA aus der Minipräparation

5 U EcoR I

5 U Not I

1x Buffer O

→ Inkubation: 1h bei 37°C

#### Sequenzierungsansatz (15 µl-Ansatz)

50 - 100 ng /µl DNA aus der Minipräparation

10 µM Primer

→ zu Eurofins Genomics GmbH gesendet

### 2.2.8 Glycerin-Langzeitlagerung und DNA-Isolation

Mit der verbliebenen Kulturlösung (Kapitel: 2.2.5), welche durch die Sequenzierung bestätigt Bakterien-Klone mit dem gewünschten Konstrukt enthält, wurde eine neue 300 ml Kultur mit LB-flüssig-Amp-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Amp) angeimpft. Von der Übernachtskultur wurde 2 ml für eine 15%ige Glycerin-Langzeitkultur abgenommen und die restliche Kulturlösung wurde für die DNA-Isolation mit dem Kit NucleoBond PC 500, MIDI (Macherey-Nagel) verwendet. Anschließend wurde die DNA-Konzentration wie in Abschnitt 2.2.6 gemessen und die DNA auf 1 µg/µl verdünnt.

## 2.3 Zellbiologische Methoden

Zur funktionellen Untersuchung von Bitterrezeptoren und deren Varianten wurden Experimente mit Hilfe eines heterologen Zellsystems durchgeführt. Dabei handelt es sich um adhärent wachsende HEK 293T-Zellen, welche stabil die G-Protein-Chimäre  $G_{\alpha 16}$ Gust44 (Chimäre aus der  $G_{\alpha 16}$ -Untereinheit und 44 AS vom C-Terminus von  $\alpha$ -Gustducin (Ueda et al., 2003)) exprimieren und durch Jay Slack zur Verfügung gestellt wurden (Givaudan Flavors Corp.).

### 2.3.1 Beschichten der Kultivierungsgefäße

Um die Haftung am Gefäßgrund zu erhöhen und ein Ablösen während des Experimentes zu verhindern, wurde der Gefäßboden der 96-Lochplatten mit 10  $\mu\text{g/ml}$  poly-D-Lysin und die Kultivierungsschalen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  poly-D-Lysin beschichtet. Das zur Beschichtung eingesetzte, überschüssige poly-D-Lysin-Lösung wurde nach 20 min entfernt, anschließend wurden die Gefäße mit autoklaviertem Wasser gespült und der größte Teil der Flüssigkeit entfernt.

### 2.3.2 Kultivierung von HEK 293T-Zellen

HEK 293T- $G_{\alpha 16}$ Gust44-Zellen wurden in serumhaltigem DMEM-Zellkulturmedium mit 400  $\mu\text{g/ml}$  G-418-Sulfat kultiviert. Das G-418-Sulfat diente der Aufrechterhaltung des Selektionsdruckes zugunsten der Zellen, die das stabil transfizierte  $G_{\alpha 16}$ Gust44-Konstrukt enthielten. Bei einer Zelldichte von ca. 90% wurde das verbrauchte Zellkulturmedium abgesaugt, die HEK 293T- $G_{\alpha 16}$ Gust44-Zellen mit 2 ml Trypsinlösung abgelöst und mit serumhaltigem Zellkulturmedium restlos heruntergewaschen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml- Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 900 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 5 ml frischem, serumhaltigem DMEM-Zellkulturmedium resuspendiert. Die Aussaat erfolgte in beschichteten Kultivierungsschalen, dabei wurde frisches, serumhaltiges DMEM-Zellkulturmedium vorgelegt, 400  $\mu\text{g/ml}$  G-418-Sulfat und Zellsuspension zugegeben. Die Menge der verwendeten Zellsuspension variierte je nach Zellwachstumsgeschwindigkeit zwischen 1:5 bis 1:10. Die Zellen wurden 3 bis 5 Tage bei 37 °C mit 5%  $\text{CO}_2$ -Partialdruck kultiviert, bevor sie erneut passagiert werden mussten.

## 2.4 Funktionsanalyse der heterolog exprimierten Bitterrezeptoren

Um funktionelle Analysen an dem unveränderten (Wildtyp, siehe Anhang 10.1) und durch Mutagenese veränderten Rezeptoren durchzuführen, wurde die entsprechenden Konstrukte in

HEK 293T-Zellen, welche stabil die G-Protein-Chimäre  $G_{\alpha 16}G_{ust44}$  exprimieren, mittels Lipofectamin 2000 transient transfiziert. Die Aktivierung des heterolog exprimierten Rezeptors konnte nach Zugabe eines Bitterstoffs direkt durch die Aktivierung der Signalkaskade, welche einen  $Ca^{2+}$ -Anstieg im Zytoplasma zur Folge hatte, über einen Kalzium-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff mit dem fluorometrischen Plattenlesegerät gemessen werden (Abbildung 6 und 11).

#### **2.4.1 Aussaat und Transfektion**

HEK 293T- $G_{\alpha 16}G_{ust44}$ -Zellen wurden in mit poly-D-Lysin beschichtete 96-Lochplatten (mit schwarzem Rahmen von Santa Cruz Biotechnologie) mit serumhaltigem DMEM-Zellkulturmedium ausgesät (siehe Abschnitt: 2.3.1 und 2.3.2 (Behrens et al., 2004)). Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei  $37^{\circ}C$  mit 5%  $CO_2$  bis zu einer 60 - 70 %igen Konfluenz. Die Transfektion mit 0,15  $\mu g$  Plasmid-DNA erfolgte mit Lipofectamin 2000 unter Nutzung von serumfreiem Medium (DMEM ohne weitere Zusätze). Bei der Plasmid-DNA handelt es sich entweder um den Leervektor (pcDNA5FRT PM) oder um den Vektor mit einer Fusionsproteinsequenz (siehe Kapitel: 2.2). Nach 4 – 5-stündiger Inkubation bei  $37^{\circ}C$  mit 5%  $CO_2$  wurde das serumfreie DMEM-Zellkulturmedium gegen serumhaltiges ersetzt und über Nacht im Brutschrank bei  $37^{\circ}C$  mit 5%  $CO_2$  inkubiert.

#### **2.4.2 Funktionelle Rezeptoranalyse über Kalzium-Detektion**

24 bis 26 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen (Behrens et al., 2004). Dazu wurde serumfreies Medium genutzt und der Farbstoff Fluo-4-AM mit 2,5 mM Probenecid eingesetzt. Nach 1 Stunde bei  $37^{\circ}C$  und 5 %  $CO_2$  wurden die 96-Lochplatten drei Mal mit C1-Puffer (10 mM Glukose, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM  $CaCl_2$ , pH 7,4) mit dem Plattenwaschgerät gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurden die 96-Lochplatten 20 min dunkel gelagert. Der dritte Waschsritt erfolgte direkt vor der Messung.

Zur Messung wurde das fluorometrische Plattenlesegerät mit der vorbereiteten 96-Loch-Testsubstanzplatte für die Erst-Applikation (zu messende Bittersubstanzen), der 96-Lochplatte für die Zweit-Applikation mit Somatostatin 14 (SST14, Endkonzentration 100nM, aktiviert den endogenen Somatostatin-Rezeptor als Zell-Vitalitätskontrolle), der gewaschenen Zell-Platte und Pipettenspitzen bestückt. Die Messung wurde mit der Software ScreenWorks (Molecular Devices) gesteuert. Nach der Einstellung der Belichtungszeit, basierend auf der

aktuellen Hintergrundfluoreszenz (Signaltest) der Messplatte wurde das Messprogramm gestartet. Die ersten 10 Messungen erfolgten alle zwei Sekunden bevor die erste Applikation stattfand. Darauf folgten 60 Messungen alle zwei Sekunden. Im zweiten Intervall wurden 18 Messungen alle 10 Sekunden durchgeführt. Danach gab es wieder 10 Messungen alle zwei Sekunden, bevor die zweite Applikation erfolgte. Nach 60 Messungen erfolgten 12 weitere Messungen alle 10 Sekunden (Abbildung 6B).

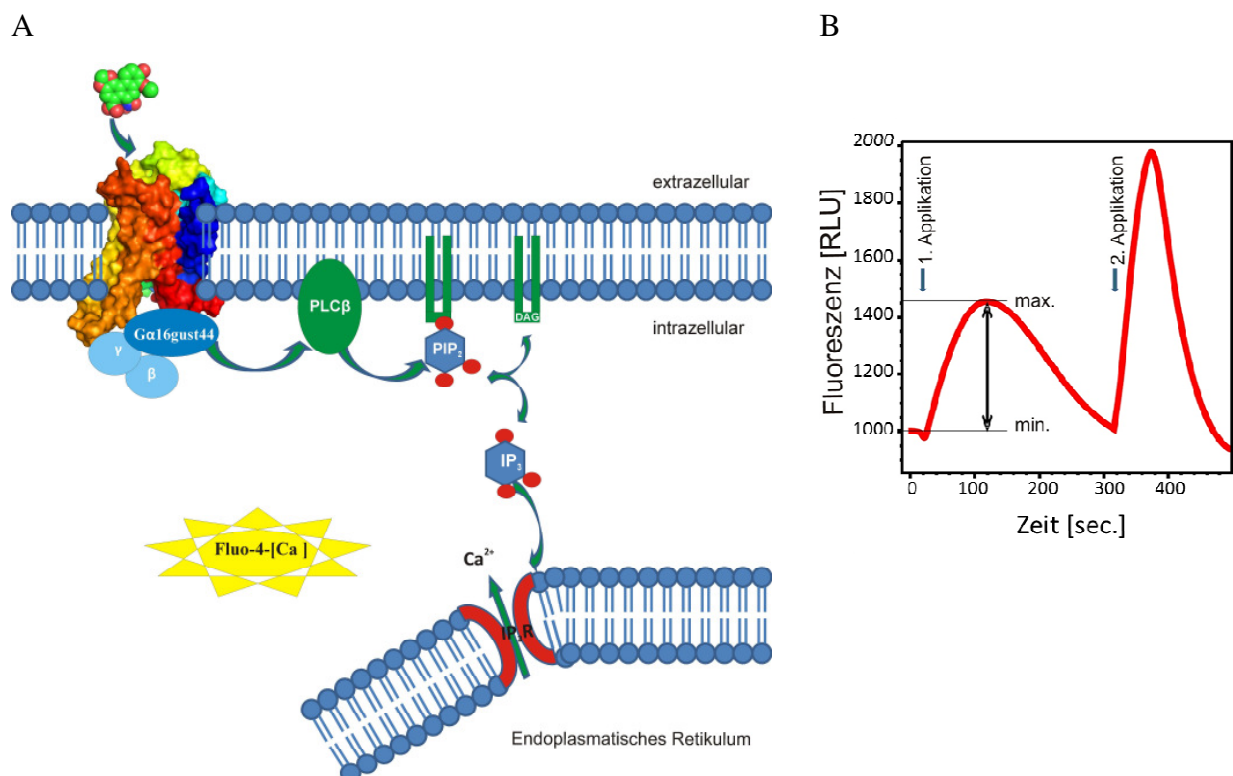


Abbildung 6: Kalziumkonzentrationsmessung über einen Kalzium-sensitiven Farbstoff

(A) Ein TAS2R14-Agonist z.B.: Aristolochiasäure aktiviert den TAS2R14-Bitterrezeptor, wodurch die Gα16Gust44-Untereinheit sich vom Rezeptor löst und die membranständige Phospholipase Cβ (PLCβ) aktiviert. Die Phospholipase Cβ hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>). Das IP<sub>3</sub> aktiviert den IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R), welcher dann Kalziumionen vom endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der Zelle entlässt. Das Kalzium komplexiert mit dem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff und (B) verursacht eine Erhöhung der Fluoreszenz durch Ca<sup>2+</sup>-Bindung nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488nm (Gee et al., 2000), wodurch indirekt die Rezeptoraktivierung nachgewiesen werden kann.

### 2.4.3 Auswertung der gemessenen Fluoreszenzänderung und Interpretation

Mit dem Programm ScreenWorks wurden die Rohdaten der einzelnen Messungen der 96 Kavitäten der jeweiligen Platte exportiert und anschließend in Excel die Berechnungen der Signale durchgeführt.

Die Hintergrundaktivierung der einzelnen Kavitäten resultiert aus dem Mittelwert der ersten 10 Messungen vor der Applikation. Anschließend wurde der Max-Min der Kavitäten, welche mit dem Leervektor transformiert worden ist, bestimmt (Max. = maximale Signalhöhe, Min.= minimale Wert auf Basisniveau, siehe Abbildung 6B). Bei den Rezeptor-transfizierten Zellen wurde die negativ-Korrektur mit den Leervektor-transfizierten Zellen eingestellt und dann ebenfalls der Max-Min-Wert bestimmt.

Die Signalwerte  $[\Delta F / F]$  wurden mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Signalwert } [\Delta F / F] = \frac{\text{Max-Min}_{\text{Testsubstanzsignal}}}{\text{Hintergrund}_{\text{C1 Lösungsmessung}}} - \text{Mittelwert} \left( \frac{\text{Max-Min}_{\text{C1 Lösungsmessung}}}{\text{Hintergrund}_{\text{C1 Lösungsmessung}}} \right)$$

Dabei wurden die exportierten Max-Min-Wert jeder Messung wurde durch die dazugehörige Hintergrundfluoreszenz geteilt und mit dem Mittelwert der C1-Lösungsmessung (ohne Substanz) der jeweiligen Rezeptoren durch Abzug korrigiert:

Bei der Untersuchung der punktmutierten TAS2R14-Rezeptoren wurde als Referenz auf jeder Messplatte die Aktivierung des Wildtyprezeptors gemessen. Die berechneten Signale der Aktivierung der einzelnen Rezeptormutanten wurden dann auf die Aktivierung des Wildtyprezeptors bei den maximal messbaren Konzentration (=100%) bezogen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel berechnet und anschließend mit der SigmaPlot-Software dargestellt. Als Schwellenwert wurde die kleinste Konzentration definiert, die zu einer signifikanten Rezeptoraktivierung führte.

Die nichtlineare Regressionskurve wurde mit der in SigmaPlot mitgelieferten Funktion ermittelt:

$$F(x) = \text{Minimum} + \frac{\text{Maximum} - \text{Minimum}}{1 + (x/EC_{50})^{-\text{Hill-Koeffizient}}}$$

und der  $EC_{50}$ -Wert mit Standardfehler angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics 20.0.0 (IBM SPSS, Chicago, IL, USA). Der statistische Vergleich von TAS2R14-„Wildtyp“ und den punktmutierten Rezeptorvarianten wurde mit ANOVA mit anschließendem Dunnets-multiple-Vergleichstest (2-seitig) für jede einzeln gemessene Konzentration durchgeführt.



## 2.5 Immunzytochemische Bestimmung der Expressionseffizienz

Die Immunzytochemie ermöglicht die Bestimmung der Expressionseffizienz, welche durch die Transfektionsrate und die rezeptorabhängige Expressionsrate bestimmt werden. Dafür wurden alle Zellen über eine Membranfärbung markiert, um die Gesamtzahl der Zellen zu bestimmen. Des Weiteren wurden die Bitterrezeptoren angefärbt, um die Zahl der exprimierenden Zellen zu bestimmen.

Des Weiteren wird die Methode zur Bestimmung der Colokalisation des Bitterrezeptors an der Zellmembran benutzt.

Die Aussagekraft der Aufnahmen des konfokalen Fluoreszenzmikroskops wird durch seine beschränkte Auflösung von ~ 150 nm bestimmt (Hell et al., 1994; Kang et al., 2013), somit bleibt unklar, ob der Rezeptor tatsächlich in der ~8 nm dicken Zellmembran (Reece et al., 2011) eingebaut wurde. Jedoch kann die räumliche Nähe des Rezeptors zur Zellmembran festgestellt werden, welches auf eine hohe Wahrscheinlichkeit des Einbaus in der Zellmembran schließen lässt.

### 2.5.1 Aussaat und Transfektion

Eine 24-Lochplatte wurde mit Deckgläschen (Ø 12mm) bestückt, mit 10 µg/ml poly-D-Lysin beschichtet und HEK 293T-G<sub>α16</sub>Gust44-Zellen mit serumhaltigem DMEM-Zellkulturmedium ausgesät (Kapitel: 2.3.1). Die Anhaftung der Zellen und das Wachstum erfolgten über Nacht mit 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck bei 37°C bis zu einer Konfluenz von 60 - 70 %. Die Plasmid-DNA (800 ng in 50 µl serumfreiem DMEM pro Deckgläschen) wurde mit Hilfe von Lipofectamin™ 2000 in die Zellen eingebracht (siehe auch Kapitel: 2.4.1). Je Konstrukt wurden je zwei Deckgläschen transfiziert. Nach der 4 – 5-stündigen Inkubation bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Partialdruck, wurde das serumfreie DMEM-Zellkulturmedium gegen serumhaltiges DMEM-Zellkulturmedium ersetzt.

### 2.5.2 Immunzytochemische Anfärbung

Zur Immunzytochemischen Anfärbung wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen zwei Mal für eine Minute mit 1x PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurde die 24-Lochplatte 30 min auf Eis gekühlt.

Die Membranfärbung erfolgte durch biotinyliertes Concanavalin A (Con A, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich) 1:2000 verdünnt in kaltem 1x PBS für eine Stunde auf Eis. Während dieses Schrittes bindet das Con A an Glycoproteine und Glycolipide der Zellmembran. Zur

Entfernung des überschüssigen Con A wurden die Zellen fünf Mal eine Minute mit kaltem 1x PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit Methanol-Aceton (1:1) für 2 min auf Eis. Nach dreimaligem Waschen wurde für 45 Minuten mit 5% Ziegen Serum in 1x PBS blockiert. Anschließend wurde mit dem Erst-Antikörper Anti-HSV aus Maus (1:15000 in Blockierlösung, 1 mg/ml, Novagen) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit 1x PBS wurde der Zweit-Antikörper, Anti-Maus-Alexa-488 aus Ziege (1:2000, 2 mg/ml, Molecular Probes) gegen den anti-HSV Antikörper aus Maus sowie Streptavidin-Alexa-633 (1:1000, 2 mg/ml Molecular Probes / Life technologies <sup>TM</sup>) gegen das biotinylierte Concanavalin A, in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen drei Mal mit 1x PBS für je 5 min gewaschen und einmal mit autoklaviertem Wasser. Die Deckgläschen verblieben in den wassergefüllten Kavitäten der 24-Lochplatte bis zum Einbetten. Das Einbetten erfolgte mit DakoCytomation Fluorescent Mounting Medium. Die Antrocknung des Einbettmediums (mindestens 4 Stunden) und die Lagerung erfolgten bei 4 °C im Dunkeln.

### 2.5.3 Visualisierung mit dem Konfokalmikroskop

Die Detektion erfolgte mit einem Konfokalmikroskop, dabei wurde mit Hilfe zweier Laser (Argon- und Helium-Neon-Laser) die Fluoreszenz bei den Wellenlänge 488 nm und 633 nm angeregt. Über die Wellenlänge 488 nm wurde der Anti-Maus-Alexa-488 angeregt und im Bereich von 500 – 530 nm detektiert, wodurch das Rezeptorfusionsprotein nachgewiesen wurde (grün dargestellt). Die Wellenlänge 633 regte das Fluorophor-konjugierte-Streptavidin an, welches an die Zellmembran (rot dargestellt) gekoppelt war und über den Bereich von 670 – 720 nm detektiert wurde.

Die Aufnahmen und die Bildüberlagerungen wurden mit dem Programm Leica confocal Software durchgeführt. Die Auszählung erfolgte mit Hilfe des Programms Image J dabei wurden 4 - 6 Aufnahmen der jeweiligen TAS2R14-Rezeptorvariante ausgezählt und die Expressionseffizienz bestimmt:

$$\text{Expressionseffizienz [\%]} = \frac{\text{rezeptorexprimierende Zellen} * 100}{\text{gesamte Zellzahl}}$$

## 2.6 Ballesteros-Weinstein-Nummerierung

Um die homologen Positionen der verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, im speziellen der TAS2R-Familie, mit Hilfe der Ballesteros-Weinstein-Nummerierung (Ballesteros et al., 1995) vergleichen zu können, wurde ein Aminosäuresequenz-Alignment von Masha Niv und Anat Levit (The Hebrew University of Jerusalem, Israel) angefertigt (siehe Anhang: Kapitel 10.6) und bereits für andere Publikationen verwendet (Born et al., 2013; Brockhoff et al., 2010).

Alle Positionsbenennungen (Abbildung 7) nach Ballesteros-Weinstein-Nummerierung dieser Arbeit beziehen sich auf bereits publizierte Angaben oder basieren auf dem Aminosäuresequenz-Alignment.

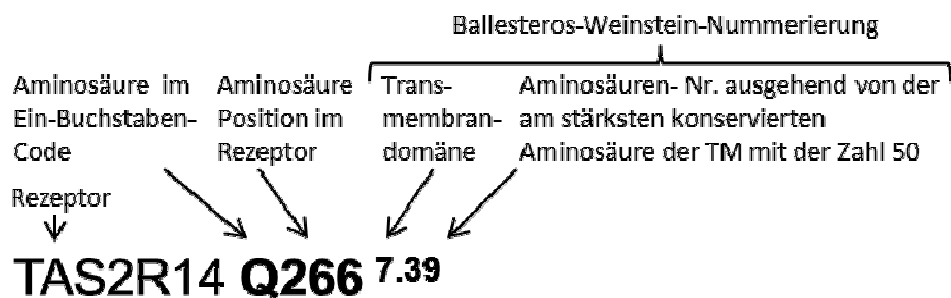


Abbildung 7: Positionsbenennung nach Ballesteros-Weinstein-Nummerierung

Nach Ballesteros-Weinstein-Nummerierung (Ballesteros et al., 1995) wird die Transmembrandomäne benannt und ausgehend von der konserviertesten Aminosäure der Transmembrandomäne mit der Zahl 50, werden die davor und dahinterliegenden Aminosäuren durchnummeriert. (Kapitel 3.1, Abbildung 9).

### 3. Ergebnisse

Zur Aufklärung der Struktur-Funktions-Beziehung des Rezeptors TAS2R14 und seinen Agonisten wurden zwei Herangehensweisen verfolgt. Zum einen lag der Fokus auf der Analyse der Bindungstasche des TAS2R14. Dazu wurde ein Homologiemodell erstellt, um potentiell wichtige Aminosäurereste der vermeintlichen Bindungstasche zu lokalisieren und über gezielte Punktmutagenese mit funktionellen Untersuchungen zu verifizieren (Kapitel: 3.1). Zum anderen wurden ausgewählt TAS2R14-Agonisten auf ihre strukturelle Beschaffenheit untersucht, um mögliche gemeinsame Merkmale der TAS2R14-Agonisten aufzudecken (Kapitel: 3.2).

#### 3.1 Charakterisierung der Bindungstasche des TAS2R14

Die Erstellung eines initialen Homologiemodells basierte auf den Kristallstrukturen des humanen  $\beta$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta$ -2adr, PDB-Code: 2RH1), des Tintenfisch-Rhodopsins (2Z73 und 2Z1Y) und des Rinder-Rhodopsins (1L9H) sowie auf einem Aminosäuresequenz-Vergleich von Bitterrezeptoren und weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (siehe Anhang: 10.8). Das Modell wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Masha Niv (The Hebrew University of Jerusalem, Israel) mit dem Programm I-TASSER durchgeführt (Levit unpubliziert).

Die anfänglichen Vorhersagen zur Lokalisation von Bindungstaschen wurden mit dem energie-basierenden Q-SiteFinder-Algorithmus getroffen (Levit unpubliziert) und mit den Befunden zur Lokalisation der Bindungstasche des  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptors abgeglichen (Masha Niv und Anat Levit (The Hebrew University of Jerusalem, Israel)).

Der TAS2R14 und der  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptor haben nur eine geringe Sequenzübereinstimmung (T-Coffee: 15 % Sequenzübereinstimmung (Identität) und 29,2 % ähnliche Aminosäuren (Ähnlichkeit). Eine Kristallstruktur eines Bitterrezeptors mit identifizierter Bindungstasche stand jedoch nicht zur Verfügung.

Des Weiteren erfolgten die ersten Alanin-Punktmutagenesen am TAS2R14 durch Mitarbeiter der Abteilung Molekularer Genetik des Deutschen Institutes für Ernährungsforschung (siehe Anhang: 10.3) und standen zur Messung der Rezeptoraktivität zur Verfügung.

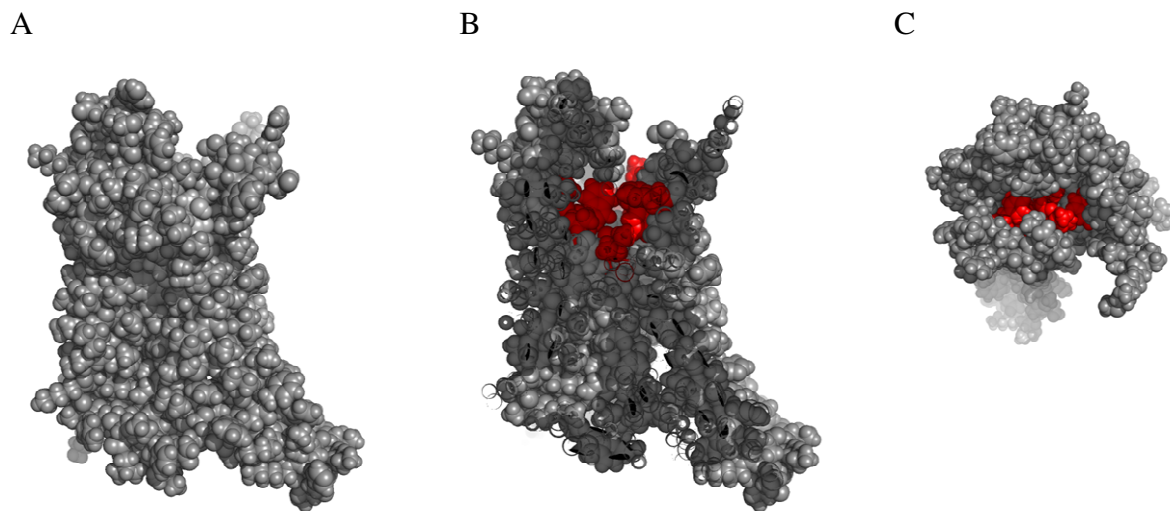


Abbildung 8: 3D Homologiemodell des Rezeptors TAS2R14

Das 3D-Homologiemodell des TAS2R14 ist als Kalottenmodell in (A) seitlicher Ansicht, (B) aufgeschnittener Ansicht mit Blick in die potentielle Bindungstasche (rot markierter Bereich) und (C) Sicht auf den extrazellulären Zugang in die Bindungstasche dargestellt.

Um dieses Modell an die neuen Erkenntnisse der Untersuchungen des Bitterrezeptors TAS2R10 (Born et al., 2013) anzupassen, wurde es von mir mit dem Programm Maestro (Schrödinger, LLC) basierend auf dem verbesserten TAS2R10-Modell überarbeitet. Der Bereich der vermuteten Bindungstasche ist in der Abbildung 8 Rot markiert.

Die vorhergesagten Rezeptorpositionen liegen hauptsächlich auf der dem extrazellulären Raum zugewandten Seite, im oberen Drittel des Rezeptors in den Transmembrandomänen III, V, VI und VII (Abbildung 9). Um die homologen Positionen zwischen den verschiedenen TAS2R Proteinen besser vergleichen zu können, wurde die Ballesteros-Weinstein-Nummerierung (B.-W. Nr., siehe Kapitel 2.6) verwendet (Ballesteros et al., 1995).

Die Eingrenzung des Bereiches, in der sich die Bindungstasche befinden könnte, ergab eine Ausdehnung von  $\sim 12 \text{ \AA}$  zwischen der Aminosäure **W66**<sup>2.61</sup> und **F247**<sup>6.55</sup>,  $\sim 9 \text{ \AA}$  von **T90**<sup>3.33</sup> bis **Q266**<sup>7.39</sup> und  $\sim 10 \text{ \AA}$  von **T86**<sup>3.29</sup> bis **H94**<sup>3.37</sup> im TAS2R14 Homologiemodell.

In der Tabelle 2 ist ein Ausschnitt des Vergleichs der Aminosäuresequenzen dargestellt. Der vollständige Aminosäuresequenzvergleich der menschlichen Bitterrezeptoren und weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist im Anhang abgebildet (siehe Anhang: 10.8). Der Ausschnitt zeigt die drei Rezeptoren mit breitem Agonistenspektrum, TAS2R14 (R14), TAS2R10 (R10) und TAS2R46 (R46), und den TAS2R13 (R13), welcher von den menschlichen TAS2Rs die höchste Homologie zum Rezeptor TAS2R14 aufweist.

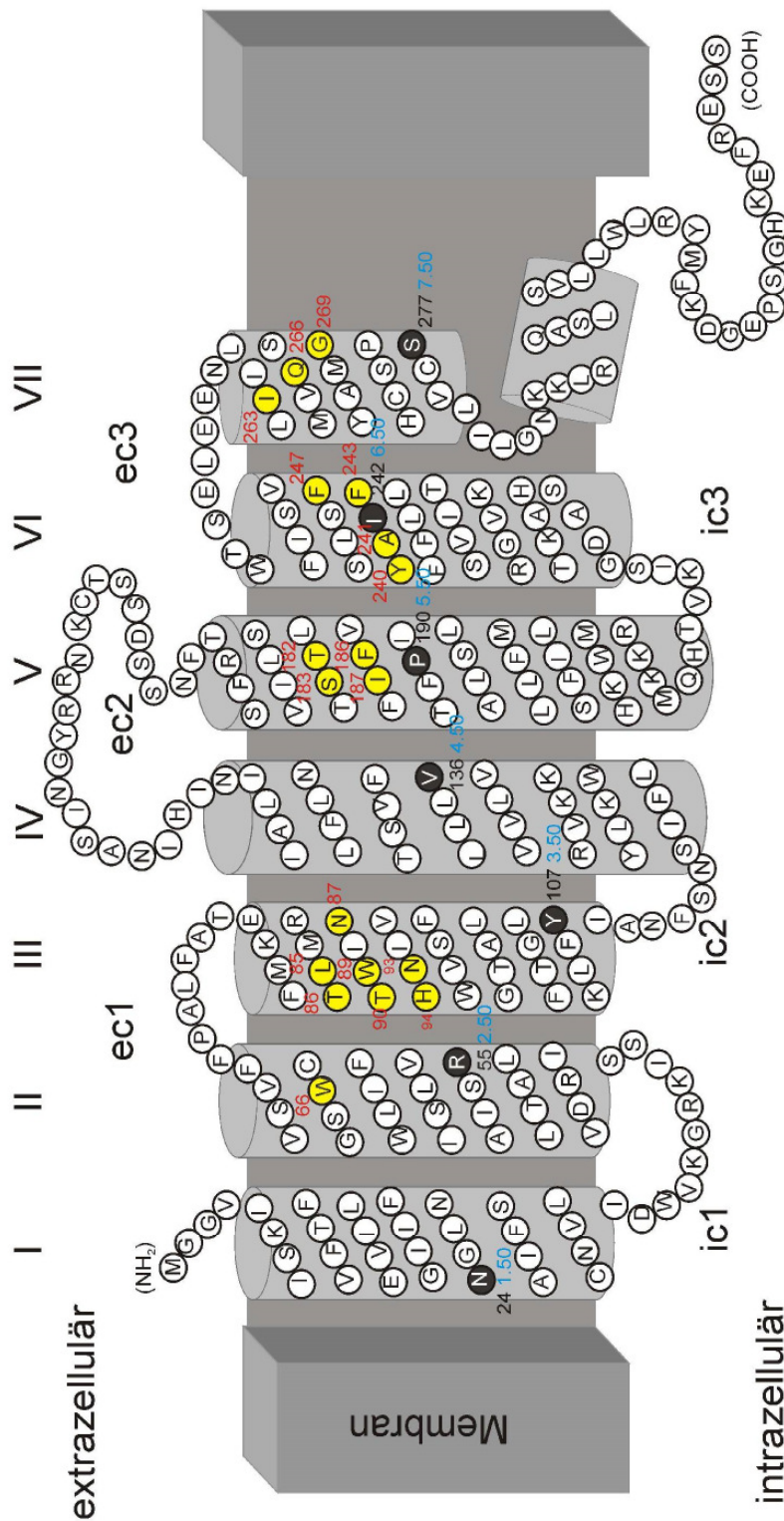


Abbildung 9: 2D-Schlagenmodell des TAS2R14

Im 2D-Schlagenmodell sind die sieben Transmembrandomänen dargestellt und bei jeder Transmembrandomäne wurde die konservierteste Position innerhalb der TAS2R-Familie mit schwarzen Kreisen und Ballesteros-Weinstein-Nummerierung (Kapitel: 2.6) in blauer Schrift markiert; die gelben Kreise mit Positionsnummer in roter Schrift zeigen die vorhergesagten Positionen, die an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt sein könnten (ec = extrazelluläre Schleifen und ic = intrazelluläre Schleifen).

Tabelle 2: Vergleich der homologen Positionen des TAS2R14, -R10, -R46 und -R13

Die Positionen der intrazellulären (ICL) und extrazellulären (ECL) Schleifen wurde hellblau hinterlegt. Des Weiteren wurden Positionen in Ballesteros-Weinstein-Nummerierung (B.-W. Nr.; in Rot) aufgelistet und die TAS2R14 Aminosäuren, bei denen eine Punktmutation zum Alanin durchgeführt wurde, grau hinterlegt. Aminosäurepositionen, welche bereits als Kontaktstellen zu Agonisten in anderen TAS2Rs identifiziert und publiziert wurden, wurden grün markiert.

B.-W. Nr.	R14	R10	R46	R13
<b>1.50</b>	N23	N23	N23	N23
<b>ICL1</b>				
<b>2.50</b>	R55	R54	R55	R55
<b>2.61</b>	W66	G65	W66	W66
<b>2.65</b>	V70	I69	E70	L70
<b>ECL1</b>				
<b>3.28</b>	L85	I84	A84	M85
<b>3.29</b>	T86	S85	Y85	I86
<b>3.30</b>	N87	Y86	N86	F87
<b>3.32</b>	W89	W88	W88	W89
<b>3.33</b>	T90	V89	A89	I90
<b>3.36</b>	N93	N92	N92	N93
<b>3.37</b>	H94	Q93	H93	H94
<b>3.50</b>	Y107	Y106	Y106	Y107
<b>ICL2</b>				
<b>4.50</b>	S138	L137	L137	L138
<b>ECL2</b>				

B.-W. Nr.	R14	R10	R46	R13
<b>5.42</b>	T182	L177	V179	T182
<b>5.43</b>	S183	L178	T180	M183
<b>5.46</b>	F186	G181	A183	F186
<b>5.47</b>	I187	V182	N184	S187
<b>5.50</b>	P190	F185	P187	P190
<b>ICL3</b>				
<b>6.42</b>	I234	I230	T232	I234
<b>6.48</b>	Y240	F236	C238	Y240
<b>6.49</b>	A241	I237	A239	A241
<b>6.50</b>	I242	L238	I240	S242
<b>6.51</b>	F243	Y239	Y241	F243
<b>6.55</b>	F247	M243	I245	V247
<b>ECL 3</b>				
<b>7.36</b>	I263	M260	M262	M264
<b>7.39</b>	Q266	M263	E265	E267
<b>7.42</b>	G269	G262	A268	G270
<b>7.50</b>	S277	S275	P276	S278

### 3.1.1 Funktionelle Charakterisierung der Alanin-punktmutierten TAS2R14-Varianten

Die ersten Untersuchungen der Bindungstasche erfolgten über gezielte Punktmutagenesen der TAS2R14 cDNA, so dass nach der Modifikation des TAS2R14-Rezeptors an einer spezifischen Position in der Bindungstasche ein Alanin anstatt der Aminosäure des Wildtyprezeptors kodiert wird. Diese Rezeptormutante wurde anschließend auf ihre Funktionalität geprüft, um die Beteiligung an der Ligandenbindung zu bestätigen oder zu widerlegen. Alanin als eine kleine, unpolare Aminosäure bietet nur wenige Möglichkeiten zu komplexen Wechselwirkungen mit Agonisten, wie etwa eine Wasserstoffbrückenbindung oder  $\pi$ -Elektronen-Wechselwirkungen (Beschreibung der möglichen Wechselwirkungen siehe Kapitel: 3.1.2). Sollte der Aminosäurerest einer experimentell veränderten Position wichtig für die Affinität des Rezeptors zu seinen Agonisten sein, könnte man dies durch eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei der funktionellen Überprüfung der

betreffenden Rezeptorvariante sichtbar machen. Bei einer verschlechterten Aktivierbarkeit des Rezeptors würde man hingegen eine verringerte Maximalamplitude erwarten. Lässt sich die Aktivierbarkeit eines modifizierten Rezeptors im funktionellen Experiment durch keine Testsubstanz nachweisen, kann man jedoch nicht direkt auf eine fehlende Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor folgern oder eine mangelnde Expression schlussfolgern. In diesem Fall könnte eine Fehlfaltung des Rezeptors vorliegen. Die Expression der punktmultierten TAS2R14 Rezeptorvarianten kann mittels immunzytochemischer Untersuchungen überprüft werden (siehe Kapitel: 2.5). Zu allen Rezeptormutanten wurden die Expressionsraten von mir bestimmt und im Anhang: 10.10 in den Abbildungen 51 - 60 dargestellt.

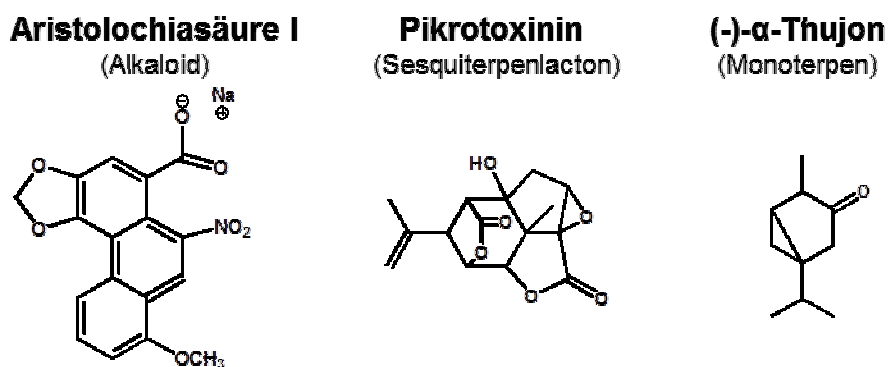


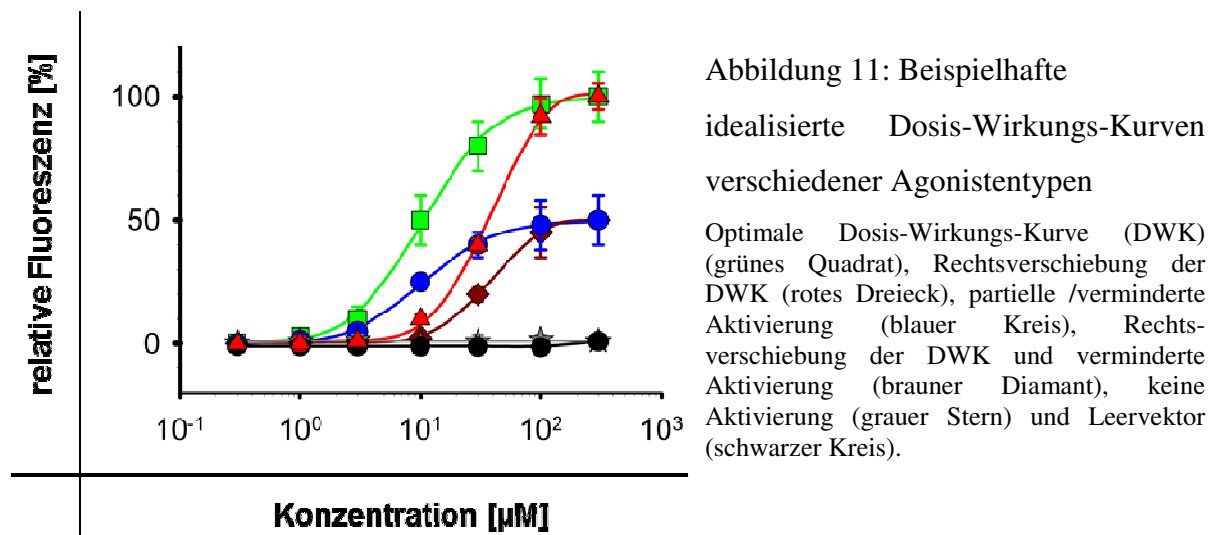
Abbildung 10: Testsubstanzen für die funktionelle Untersuchung der TAS2R14-Rezeptormutanten

Dargestellt sind die drei Testsubstanzen mit ihren Substanznamen, Substanzgruppen (in Klammern) und den Strukturformeln.

Die funktionellen Untersuchungen der 19 Alanin-Punktmutanten und einer weiteren Mutante A241I (im Wildtyp vorhandenes Alanin wurde durch ein Isoleucin ersetzt) wurden mit den Agonisten des TAS2R14: Aristolochiasäure (Sainz et al., 2007), Pikrotoxinin und Thujon (Behrens et al., 2004) durchgeführt (Abbildung 10). Die Testsubstanzen unterscheiden sich in ihrer chemischen Zugehörigkeit.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve des TAS2R14-Wildtyps mit Aristolochiasäure zeigt eine sehr hohe Maximalamplitude (siehe Kapitel: 3.2.2) und könnte somit als Vollagonist (Abbildung 11) bezeichnet werden (Hoyer et al., 1993).





Im Gegensatz dazu erreicht die Substanzen Pikrotoxinin eine geringere Maximalamplitude bei der Sättigungskonzentration (Partialagonist; Abbildung 11). Mit den messbaren Konzentrationen von Thujon konnte keine Sättigung erreicht werden. Die Substanz wurde jedoch als eine kleine Substanz mit in die Untersuchungen aufgenommen.

Die höchste messbare Konzentration wird einerseits durch die Löslichkeit der Testsubstanz bestimmt und andererseits wird die höchste Konzentration so gewählt, dass keine Signale bei der Messung von Zellen mit transfiziertem Vektor ohne Rezeptorgen auftreten.

Die Messung der einzelnen Alanin-Punktmutanten des TAS2R14s erfolgte als Dreifachbestimmung auf einer Messplatte und wurde mindestens einmal an einem anderen Messtag wiederholt.

Die Zusammenfassung der Messergebnisse der 19 Alanin-Punktmutierten Rezeptorvarianten und des TAS2R14 Wildtyps ist in der Tabelle 3 zusammengefasst. Verglichen werden die Schwellenwerte (TH), die  $EC_{50}$ -Werte, woraus sich eine Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt und die Amplituden bei der höchsten gemessenen Konzentration. Als Schwellenwert (TH) wird die geringste gemessene Konzentration mit einer signifikanten Aktivierung des Bitterrezeptors durch eine Substanz angegeben. Zur statistischen Auswertung mit dem Programm Statistics Software Package SPSS Statistics 20.0.0 (IBM SPSS, Chicago, IL, USA) wurde für jede Konzentration ein ANOVA-Test mit anschließendem Dunnett-multiple-Vergleichstest (2-seitig) durchgeführt. Dabei wurden die Signalhöhen der Mutante mit denen des Wildtyps verglichen.

Tabelle 3: Funktionelle Charakterisierung der TAS2R14-Alanin-Punktmutanten

Dargestellt sind alle Untersuchungen des Wildtyps und der Alanin-Punktmutaten mit den Substanzen, Aristolochiasäure, Pikrotoxinin und Santonin. Aufgeführt sind die Schwellenwerte (TH), die EC<sub>50</sub>-Werte (n.d. = EC<sub>50</sub>-Wert nicht bestimmbar) und die Signalamplituden bei der höchsten gemessenen Konzentration (max.A. = maximale Aktivierung). Die maximale Aktivierung wurde mit 30 µM Aristolochiasäure, 300 µM Pikrotoxinin und 100 µM Santonin gemessen und die max.A. wurde auf die Aktivierung des Wildtyprezeptors bezogen.

TAS2-R14	Aristolochiasäure			Pikrotoxinin			Thujon		
	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A. [%]	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A. [%]	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A. [%]
Wildtyp	0,1	0,49 ± 0,03	100	3,0	13,16 ± 0,93	100	3,0	17,12 ± 0,43	100
W66A	1,0	4,42 ± 0,33	112	10,0	74,46 ± 8,53	140	10,0	55,79 ± 6,75	78
L85A	0,1	1,04 ± 0,08	113	3,0	23,36 ± 0,22	144	30,0	n.d.	34
T86A	0,1	0,92 ± 0,05	103	30,0	96,38 ± 7,64	59	3,0	14,10 ± 0,59	87
N87A	0,3	2,08 ± 0,20	131	10,0	58,04 ± 3,78	140	10,0	41,45 ± 4,54	102
W89A	1,0	3,71 ± 0,16	100	-	n.d.	-	-	n.d.	-
T90A	0,1	0,90 ± 0,11	118	3,0	16,76 ± 0,57	72	3,0	18,61 ± 2,09	101
N93A	1,0	4,86 ± 0,18	97	10,0	39,15 ± 1,70	127	30,0	60,33 ± 15,96	56
H94A	1,0	3,32 ± 0,11	102	3,0	24,84 ± 1,77	160	10,0	35,55 ± 1,27	113
T182A	0,3	1,05 ± 0,05	104	3,0	20,35 ± 1,73	131	10,0	32,86 ± 4,08	93
S183A	0,1	0,53 ± 0,04	108	3,0	23,22 ± 0,89	84	10,0	31,42 ± 2,39	89
F186A	0,3	2,21 ± 0,13	88	10,0	17,77 ± 1,08	105	10,0	n.d.	34
I187A	0,1	0,31 ± 0,07	94	-	n.d.	-	10,0	29,76 ± 2,51	61
Y240A	1,0	4,77 ± 0,09	74	10,0	18,13 ± 0,92	73	10,0	40,88 ± 17,09	44
A241I	0,1	1,63 ± 0,14	94	10,0	24,39 ± 1,56	90	10,0	32,61 ± 4,41	59
F243A	0,1	0,43 ± 0,05	102	3,0	23,58 ± 0,34	96	3,0	18,14 ± 0,75	81
F247A	1,0	3,97 ± 0,15	74	10,0	20,45 ± 1,00	97	10,0	19,74 ± 0,71	87
I263A	0,3	1,10 ± 0,10	94	3,0	14,35 ± 1,74	133	10,0	29,40 ± 3,95	64
Q266A	0,1	0,37 ± 0,04	118	100,0	n.d.	63	30,0	n.d.	52
G269A	0,1	0,37 ± 0,05	115	0,3	1,10 ± 0,17	133	1,0	4,45 ± 0,28	123

Vergleicht man die Messungen der Alaninpunktmutanten **W66A**<sup>2.61</sup>, **L85A**<sup>3.28</sup>, **N87A**<sup>3.30</sup>, **N93A**<sup>3.36</sup>, **H94A**<sup>3.37</sup>, **Y240A**<sup>6.48</sup>, **A241I**<sup>6.49</sup> und **F247A**<sup>6.55</sup> für die einzelnen Substanzen mit der jeweiligen Aktivierung des Wildtyprezeptors, so ist für alle Mutanten eine Erhöhung der EC<sub>50</sub>-Werte erkennbar. Das Ausmaß der Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve unterscheidet sich je nach Punktmutante und verwendeter Testsubstanz. Sechs Alaninmutanten werden durch mindestens eine Testsubstanz wie der Wildtyp aktiviert und werden daher nur von einigen Agonisten als Interaktionsposition benötigt (**86**<sup>3.30</sup> und **90**<sup>3.33</sup>

durch Thujon; **186**<sup>5.46</sup> durch Pikrotoxinin sowie **187**<sup>5.47</sup>, **243**<sup>6.51</sup> und **266**<sup>7.39</sup> durch Aristolochiasäure).

Für die Mutanten **T182A**<sup>5.42</sup>, **S183A**<sup>5.43</sup> und **I263A**<sup>7.36</sup> konnte zwar teilweise eine Abweichung zur Aktivierung des Wildtyps festgestellt werden, jedoch war diese nicht auffällig groß und wurde nicht weiter untersucht.

Interessanterweise führt die Punktmutation Glycin zu Alanin der Position **269**<sup>7.42</sup> zu einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve bei allen drei Testsubstanzen, was auf einen möglichen störenden Effekt der Wildtypamino­säure auf die Potenz der untersuchten Agonisten hinweist.

Die Mutagenese der Position **89**<sup>3.32</sup> von Tryptophan zu Alanin verschlechterte die Aktivierbarkeit des Rezeptors für alle 3 Testsubstanzen, für Pikrotoxinin und Thujon war die Aktivierung nicht mehr möglich.

Die konservierten Aminosäuren der Positionen 2.61, 3.32, 3.36 und 3.37 innerhalb der TAS2R-Familie (bei TAS2R14: **W66**<sup>2.61</sup>, **W89**<sup>3.32</sup>, **N93**<sup>3.36</sup> und **H94**<sup>3.37</sup>) wurden bereits in den Rezeptoren TAS2R10 und -R46 durch Punktmutagenese zu Alanin verändert und die punktmutierten Rezeptorvarianten mit den entsprechenden Agonisten untersucht. Dabei zeigten die Alanin-punktmutierten Rezeptoren eine fehlende Aktivierung durch alle Testsubstanzen. Durch die fehlende Aktivierung bleibt unklar, ob der Rezeptor möglicherweise fehlgefaltet ist oder ob eine fehlende Interaktion verantwortlich für den Aktivierungsverlust ist.

Der Rezeptor TAS2R14 hingegen verhält sich stabiler gegenüber der Alanin-Punktmutagenese an diesen Positionen. Die Rezeptormutanten des TAS2R14, **W66A**<sup>2.61</sup>, **N93A**<sup>3.36</sup> und **H94A**<sup>3.37</sup>, können durch alle drei Testsubstanzen aktiviert werden. Nur **W89A**<sup>3.32</sup> zeigt einen Aktivierungsverlust bei Stimulation mit Pikrotoxinin und Thujon. Da Aristolochiasäure diese Rezeptorvariante immer noch aktivieren kann, ist der Beweis erbracht, dass der Rezeptor an sich funktionstüchtig ist. Dieses Resultat ermöglicht Schlussfolgerungen zur Beteiligung dieser Positionen an der Agonisteninteraktion (Diskussionskapitel: 4.3.1).

Zur Charakterisierung der jeweiligen Natur der Rezeptor-Agonisten-Interaktion an den identifizierten Aminosäurepositionen in der Bindungstasche wurden weitere Punktmutanten erstellt und anschließend funktionell charakterisiert (siehe Kapitel: 3.1.2).

### 3.1.2 Detaillierten Analysen der an der Ligandenbindung beteiligten Reste

Um die augenscheinlich an der Agonisteninteraktion beteiligten TAS2R14 Positionen näher zu untersuchen, wurden weitere punktmutierte Rezeptorvarianten hergestellt. Die Messungen der Aktivierung der Rezeptormutanten durch Agonisten dienten der Bestätigung der Interaktion und gleichzeitig der Eingrenzung der zugrundeliegenden Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Aminosäuren (AS-Eigenschaften siehe Anhang: 10.12, Abbildung 61) in der Bindungstasche des Wildtyp TAS2R14-Rezeptors und den verschiedenen Agonisten.

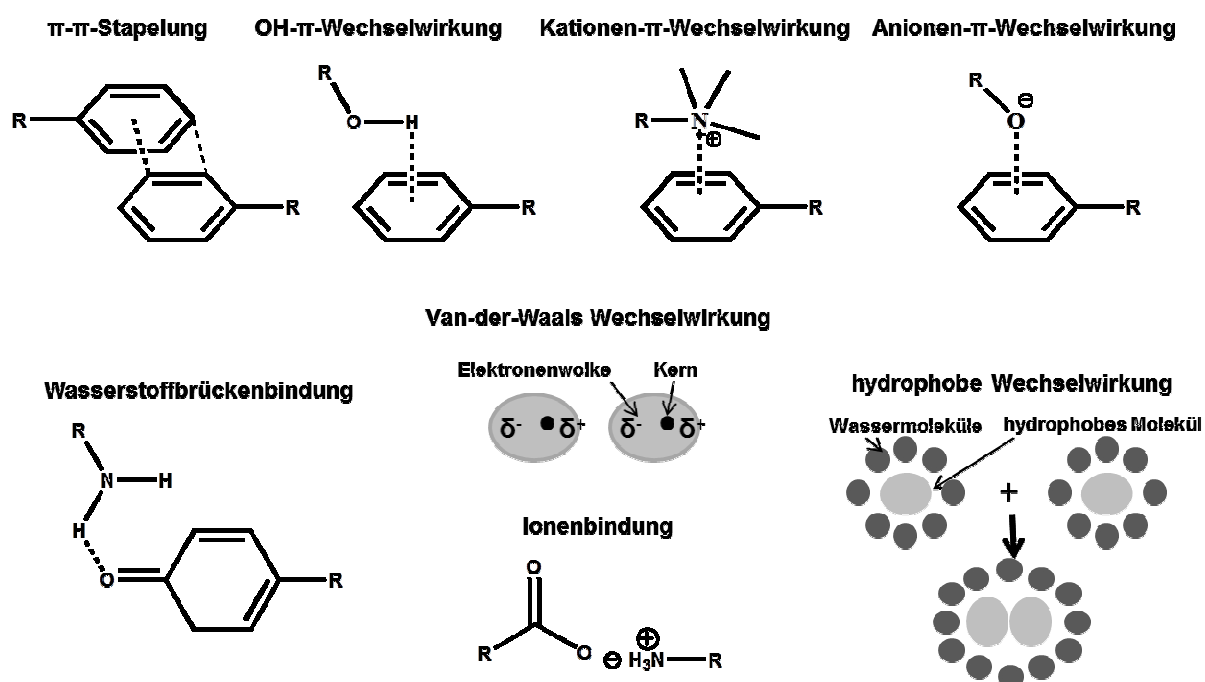


Abbildung 12: Nichtkovalente Wechselwirkungen

Dargestellt sind sieben verschiedene nichtkovalente Wechselwirkungen mit je einem Modell (Ljungh et al., 2006; Steed et al., 2007). Bei der  $\pi$ - $\pi$ -Stapelung findet eine Interaktion zwischen den  $\pi$ -Elektronen zweier aromatischer Ringe statt. Bei der OH- $\pi$ -, Kationen- $\pi$ - und Anionen- $\pi$ -Wechselwirkung interagieren der Wasserstoff, das Kation und das Anion mit den  $\pi$ -Elektronen eines aromatischen Ringsystems. Die Wasserstoffbrückenbindung besteht aus einer Anziehung zwischen dem Wasserstoffatom mit einer positiven Partialladung ( $\delta^+$ ) und der negativen Partialladung ( $\delta^-$ ) beispielsweise vom Sauerstoffatom. Bei der Van-der-Waals-Wechselwirkung handelt es sich um induzierte Dipole, wobei es zur Anziehung zwischen Elektronenwolken ( $\delta^-$ ) und Atomkernen ( $\delta^+$ ) kommt. Bei der Ionenbindung ziehen sich ein Anion und ein Kation an. Die hydrophobe Wechselwirkung beruht auf der energetisch günstigeren Zusammenlagerung von hydrophoben Molekülen in wässriger Lösung.

Bei der Interaktion zwischen den Aminosäureresten eines Rezeptors und seinem Agonisten handelt es sich in der Regel um nicht-kovalente Wechselwirkungen (Jastorff et al., 2003).

Zu den nicht-kovalenten Wechselwirkungen gehören die  $\pi$ -Elektronen-Interaktion (Brandl et al., 2001; Dougherty, 1996; Giese, 2011; Hunter et al., 2002; Kryger et al., 1999; Meyer, 2003; Steiner et al., 2001), Wasserstoffbrückenbindung (Baker et al., 1984; Jiang et al., 2002),

hydrophobe Wechselwirkung (Kneussel et al., 1999), Van-der-Waals-Interaktion und ionische Interaktion (Steed et al., 2007) (Abbildung 12).

Bei der Vorhersage der Interaktionsmöglichkeiten konnten die Aminosäuren an den vorhergesagten Positionen nach den Interaktionsarten in drei Gruppen eingeteilt werden:

- 1)  $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder hydrophobe Wechselwirkungen zum Agonisten über aromatische Ringe (Kapitel: 3.1.2.1)
- 2)  $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder Wasserstoffbrückenbindung zu polaren Gruppen (Kapitel: 3.1.2.2)
- 3) Hydrophobe Wechselwirkung zu unpolaren Gruppen (Kapitel: 3.1.2.3)

Die funktionellen Ergebnisse der detaillierten Analyse mit weiteren Punktmutationen sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

### **3.1.2.1 Positionen mit möglicher $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder hydrophober Wechselwirkung zum Agonisten über aromatische Ringe**

Die Aminosäuren **W66**<sup>2.61</sup>, **W89**<sup>3.32</sup>, **F186**<sup>5.46</sup>, **F243**<sup>6.51</sup> und **F247**<sup>6.55</sup> bieten die Möglichkeit einer  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zum Agonisten. Bei der Position **66**<sup>2.61</sup> und **89**<sup>3.32</sup> wurde das Tryptophan (W) durch Phenylalanin (F), welches ebenfalls einen aromatischen Ring besitzt, ausgetauscht (Abbildung 13).

Die Rezeptorvariante **W66F**<sup>2.61</sup> zeigt für alle drei Testsubstanzen eine gleiche Aktivierung oder sogar eine Linksverschiebung des  $EC_{50}$ -Wertes verglichen mit dem Wildtyprezeptor. Somit ist eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ring, dem Tryptophan an der Position **66**<sup>2.61</sup> und den Testsubstanzen möglich. Die Interaktion zum sekundären Amin des Tryptophans kann somit ausgeschlossen werden.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve bei der Messung der Rezeptormutante **W89F**<sup>3.32</sup> zeigte mit Thujon eine Linksverschiebung und bei Aristolochiasäure und Pikrotoxinin eine kleine Rechtsverschiebung (Aristolochiasäure: Wildtyp:  $EC_{50} = 0,49 \pm 0,03 \mu\text{M}$ , W89F:  $EC_{50} = 0,81 \pm 0,13 \mu\text{M}$  und Pikrotoxinin: Wildtyp:  $EC_{50} = 13,16 \pm 0,93 \mu\text{M}$ , W89F:  $EC_{50} = 38,99 \pm 2,41 \mu\text{M}$ ). Bei der Interaktion mit Thujon ist eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zur Position **W89**<sup>3.32</sup> denkbar. Die Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve weist darauf hin, dass Phenylalanin, welches ebenfalls die Möglichkeit einer  $\pi$ -Elektronen-Interaktion und einer hydrophoben Wechselwirkung bietet, jedoch räumlich günstiger für die Interaktion zu sein scheint als Tryptophan.

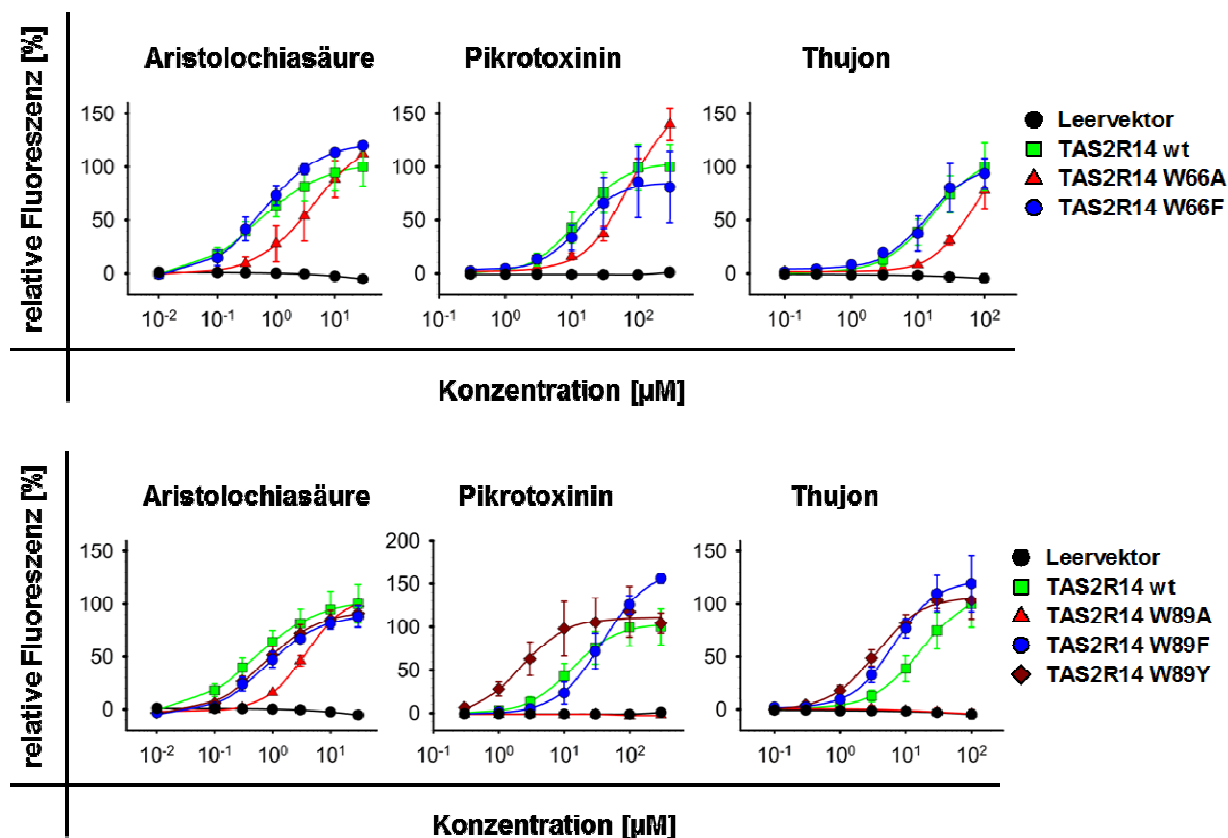


Abbildung 13: Aktivierung der Rezeptormutanten der Positionen **66**<sup>2.61</sup> und **89**<sup>3.32</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmutierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [ $\mu\text{M}$ ] dargestellt.

Die Messung der Rezeptorvariante **W89Y**<sup>3.32</sup> für Thujon zeigt das gleiche Ergebnis für die Aktivierungseigenschaften des Rezeptors wie die Messung von **W89F**<sup>3.32</sup>. Da auch Tyrosin die Möglichkeit einer  $\pi$ -Elektronen-Interaktion bietet, deutet auch das Ergebnis der Untersuchung der Tyrosinmutante auf eine Interaktion des Agonisten zum aromatischen Ring der Aminosäure hin.

Die Interaktion von Aristolochiasäure mit TAS2R14 wird durch Alanin an dieser Position am stärksten gestört, aber auch Phenylalanin und Tyrosin können Tryptophan nicht adäquat ersetzen. Möglicherweise ist dabei die genaue Position des aromatischen Rings der Aminosäure in den Bindungstasche entscheidend.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve der Aktivierung von der Rezeptormutante mit dem unpolaren Phenylalanin (F) an der Position **89**<sup>3.32</sup> durch Pikrotoxinin zeigte eine nur leichte Rechtsverschiebung der DKW verglichen mit dem Wildtyprezeptor. Daher ist eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zwischen dem aromatischen Ring der Aminosäure an dieser Position und Pikrotoxinin sehr wahrscheinlich. Anschließend wurde durch Punktmutagenese die

Aminosäure Tyrosin (Y) an die Position **89**<sup>3.32</sup> eingefügt. Tyrosin bietet wie Tryptophan und Phenylalanin die Möglichkeit einer  $\pi$ -Elektronen-Interaktion, hat aber eine zusätzliche Hydroxylgruppe und ist somit polar (H-Donator). Bei der Aktivierung der **W89Y**<sup>3.32</sup> Rezeptorvariante durch Pikrotoxinin zeigt die DWK eine Linksverschiebung. Dass heißt, Pikrotoxinin kann nicht nur mit einem aromatischen Ring an dieser Position interagieren, sondern profitiert auch von der polaren Eigenschaft des Tyrosins der punktmultierten Rezeptorvariante.

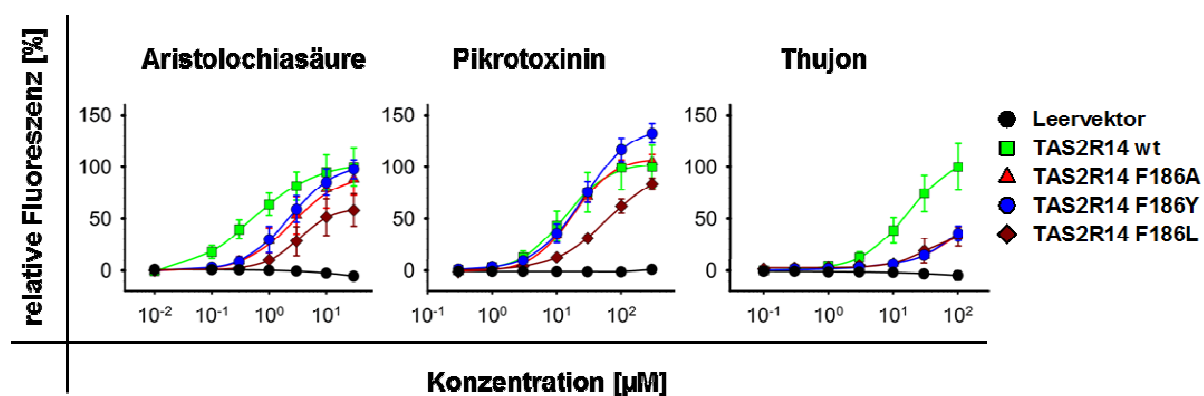


Abbildung 14: Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position **186**<sup>5.46</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmultierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [ $\mu$ M] dargestellt.

Bei den Positionen **186**<sup>5.46</sup>, **243**<sup>6.51</sup> und **247**<sup>6.55</sup> wurde das Phenylalanin (F) auch mit Hilfe der Punktmutagenese durch Tyrosin (Y) ausgetauscht. Bei der Aktivierung der Mutante **F186Y**<sup>5.46</sup> durch Aristolochiasäure und Thujon werden höhere Konzentrationen zur Aktivierung benötigt, woraus sich eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ergibt (Abbildung 14). Diese Verschlechterung der Sensitivität könnte mit der Hydroxylgruppe zu tun haben und somit kann eine mögliche hydrophobe Wechselwirkung gestört sein. Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion wurde eine Rezeptormutante mit der Aminosäure Leucin (L) hergestellt. Leucin besitzt eine ähnliche Größe und kann als aliphatische Aminosäure nur für hydrophobe Interaktionen zur Verfügung stehen. **F186L**<sup>5.46</sup> zeigte für alle Substanzen eine starke Verschlechterung der Aktivierung, was eine hydrophobe Wechselwirkung ausschließt und einen Hinweis auf eine fehlende  $\pi$ -Elektronen-Interaktion an dieser Position gibt.

Die Messung der Alaninmutante zeigte, dass Pikrotoxinin die Position nicht zur Interaktion benötigt, interessanterweise kam es zu einer verbesserten Effizienz bei der Aktivierung des Rezeptors mit einem Tyrosin (Y) an dieser Position.

Die Rezeptormutante **F243A**<sup>6.51</sup> konnte mit Aristolochiasäure im gleichen Maße wie der Wildtyprezeptor aktiviert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass keine Interaktion zum Phenylalanin an der Position **243**<sup>6.51</sup> stattfindet (Abbildung 15). Bei der Messung der Rezeptorvariante **F243Y**<sup>6.51</sup> mit Aristolochiasäure zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Die Hydroxylgruppe des Tyrosins scheint sich störend auszuwirken. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die Aristolochiasäure in der Bindungstasche in räumlicher Nähe zu dieser Position befindet. Die Aktivierung der Alaninmutante als auch der Mutante **F243Y**<sup>6.51</sup> durch Pikrotoxinin und Thujon ist nur gering abweichend von der Wildtypaktivierung. Für beide Substanzen scheint die Auskleidung der Bindungstasche an dieser Stelle mit einer unpolaren, größeren Aminosäure günstig zu sein.

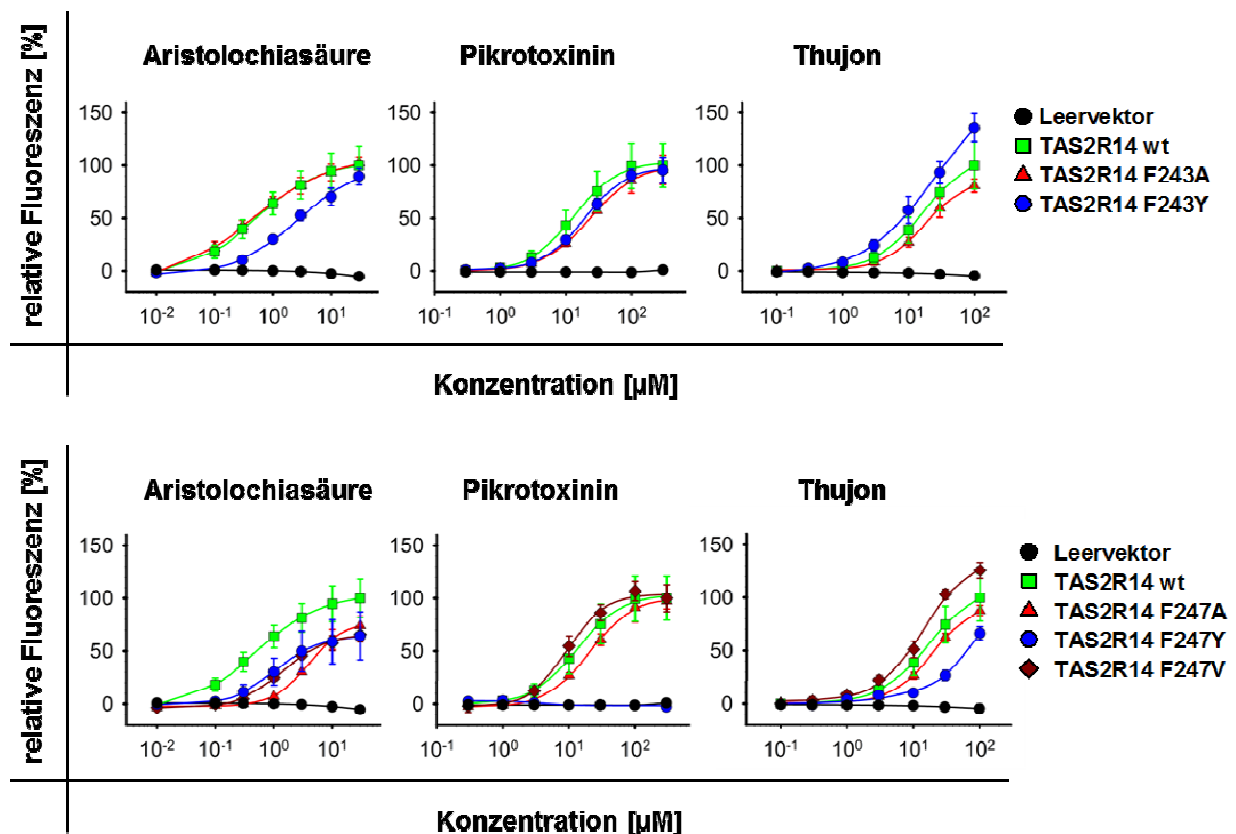


Abbildung 15: Aktivierung der Rezeptormutanten der Positionen **243**<sup>6.51</sup> und **247**<sup>6.55</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmultierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [ $\mu\text{M}$ ] dargestellt.

Auch an der Position **247**<sup>6.55</sup> wurde Phenylalanin (F) durch Tyrosin (Y) ersetzt (Abbildung 15). Pikrotoxinin und Thujon zeigten eine starke Verschlechterung der Rezeptormutante mit



Tyrosin. Möglicherweise stört die polare Eigenschaft des Tyrosin oder dessen Größe. Um zu prüfen, ob diese Position für eine hydrophobe Wechselwirkung benötigt wird, wurde eine weitere Rezeptorvariante mit Valin hergestellt. Die Rezeptormutante **F247V**<sup>6.55</sup> zeigte für Pikrotoxinin und Thujon eine gleiche oder sogar verbesserte Aktivierung verglichen mit dem Wildtyprezeptor. Dieses Ergebnis spricht für eine hydrophobe Wechselwirkung dieser Agonisten mit der Position **247**<sup>6.55</sup>.

Die Aktivierung aller Mutanten der Position **247**<sup>6.55</sup> mit Aristolochiasäure zeigt eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven, wodurch eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zum aromatischen Ring des Phenylalanins im Wildtyprezeptor wahrscheinlich ist.

### 3.1.2.2 Positionen mit möglicher $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder Wasserstoffbrückenbindung

Die Aminosäuren der Positionen **86**<sup>3.29</sup>, **90**<sup>3.33</sup>, **93**<sup>3.36</sup>, **240**<sup>6.48</sup> und **266**<sup>7.39</sup> weisen die Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung und OH- $\pi$ -Wechselwirkung zu Agonisten auf. Die homologe Aminosäure zu **T86**<sup>3.29</sup> im TAS2R14 wurde bereits im TAS2R10 (Born et al., 2013) als wichtige Interaktionsposition für Strychnin identifiziert und soll daher als Erstes betrachtet werden (Abbildung 16). Aristolochiasäure hatte einen leicht höheren EC<sub>50</sub>-Wert bei der Messung der Mutante **T86A**<sup>3.29</sup>, zeigte aber die gleiche Aktivierung bei der Messung der Punktmutante **T86V**<sup>3.29</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass zwischen Aristolochiasäure eine hydrophobe Interaktion zur Methylgruppe der Threoninseitenkette der Position **86**<sup>3.29</sup> im Wildtyp vorliegen könnte. Die Abweichungen können aber auch rein sterisch begründet sein und somit würde keine Interaktion vorliegen.

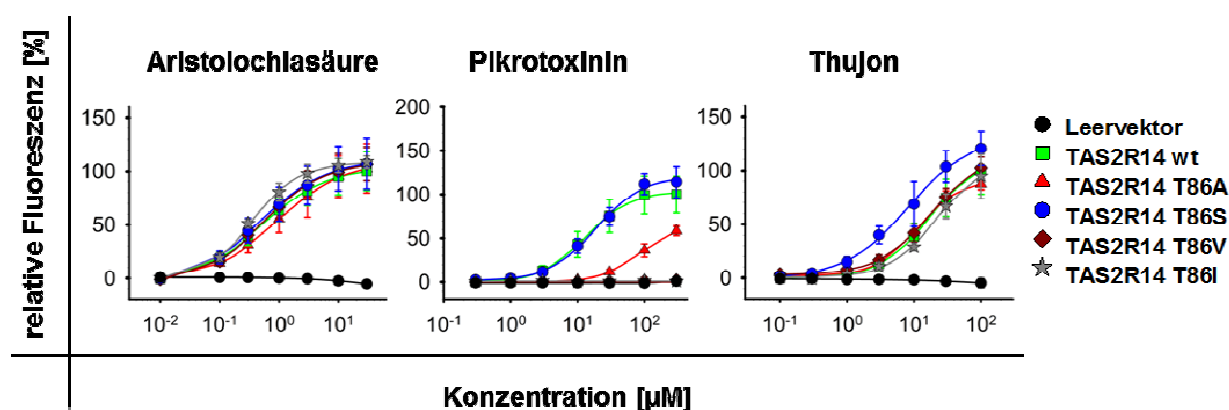


Abbildung 16: Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position **86**<sup>3.29</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmultierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [ $\mu$ M] dargestellt.

Die Dosis-Wirkungs-Kurve von Pikrotoxinin bei der Aktivierung der Rezeptormutante **T86A**<sup>3,29</sup> zeigt eine Rechtsverschiebung des EC<sub>50</sub>-Wertes, bei der Rezeptormutante **T86V**<sup>3,29</sup> keine Aktivierung und mit Serin an der Position **86**<sup>3,29</sup> eine Wildtyp-vergleichbare Aktivierung. Diese Ergebnisse lassen auf eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Threonin und Pikrotoxinin schließen.

Die Untersuchung der Mutante **T86A**<sup>3,29</sup> deutet darauf hin, dass Thujon nicht mit dieser Position interagiert, da die Aktivierung des punktmultierten Rezeptors mit dem Wildtyp vergleichbar ist. Die Aktivierung der Punktmutante **T86S**<sup>3,29</sup> mit Thujon zeigte eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve im Vergleich zur Aktivierung des Wildtyps.

Der Austausch der Wildtypaminoäure Threonin zu den unpolaren größeren Aminosäuren Valin hat keinen Effekt auf die Aktivierung durch Thujon. Der Austausch zu Isoleucin an dieser Position scheint sterisch ungünstig für die Interaktion zu sein, da eine Rechtsverschiebung in der Dosis-Wirkungs-Kurve auftrat.

Die Rezeptorvariante mit der Punktmutation **T90I**<sup>3,33</sup> zeigte für alle Testsubstanzen, außer Pikrotoxinin, eine mit dem Wildtyp vergleichbare Aktivierung (Abbildung 17). Daraus lässt sich schließen, dass die Substanzen nicht mit dieser Position interagieren und die längere Seitenkette des Isoleucins nicht räumlich störend wirkt.

Bei Pikrotoxinin scheint eine Interaktion zur Hydroxylgruppe des Threonins an der Position **90**<sup>3,33</sup> zu existieren, da sowohl das unpolare Alanin als auch das größere, unpolare Isoleucin einen höheren EC<sub>50</sub>-Wert verursachen. Zur Bestätigung dieser Vermutung könnte ein Serin an diese Position gebracht werden und Pikrotoxinin müsste dann den Rezeptor wieder besser aktivieren können.

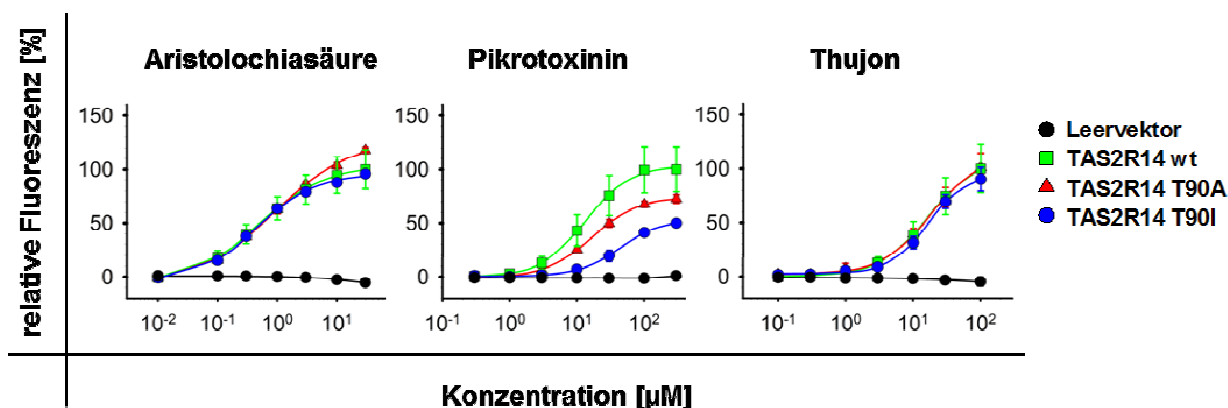


Abbildung 17: Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position **90**<sup>3,33</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmultierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [µM] dargestellt.

In der weiteren Untersuchung des TAS2R14 an der Position **N93**<sup>3,36</sup> konnte für Aristolochiasäure und Thujon beim Einbau eines Glutamins (Q) eine Verbesserung der TAS2R14-Aktivierung gegenüber der Alaninmutante gezeigt werden (Abbildung 18).

Glutamin ist wie Asparagin durch seine Säureamidgruppe polar, jedoch ist Asparagin um eine Methylengruppe (CH<sub>2</sub>-Einheit) kleiner. Aristolochiasäure und Thujon scheinen mit der Säureamidgruppe zu interagieren. Die leichte Abweichung der Aktivierung, verglichen zum Wildtyprezeptor, scheint aus der abweichenden Größe des Glutamins zu resultieren. Für Aristolochiasäure wirkt sich das größere Glutamin sterisch sogar günstig auf die Effizienz aus. Für Pikrotoxinin hingegen war die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve bei der **N93Q**<sup>3,36</sup> genauso groß wie bei der Alaninmutante. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Größenabweichung hier eine größere Rolle spielt.

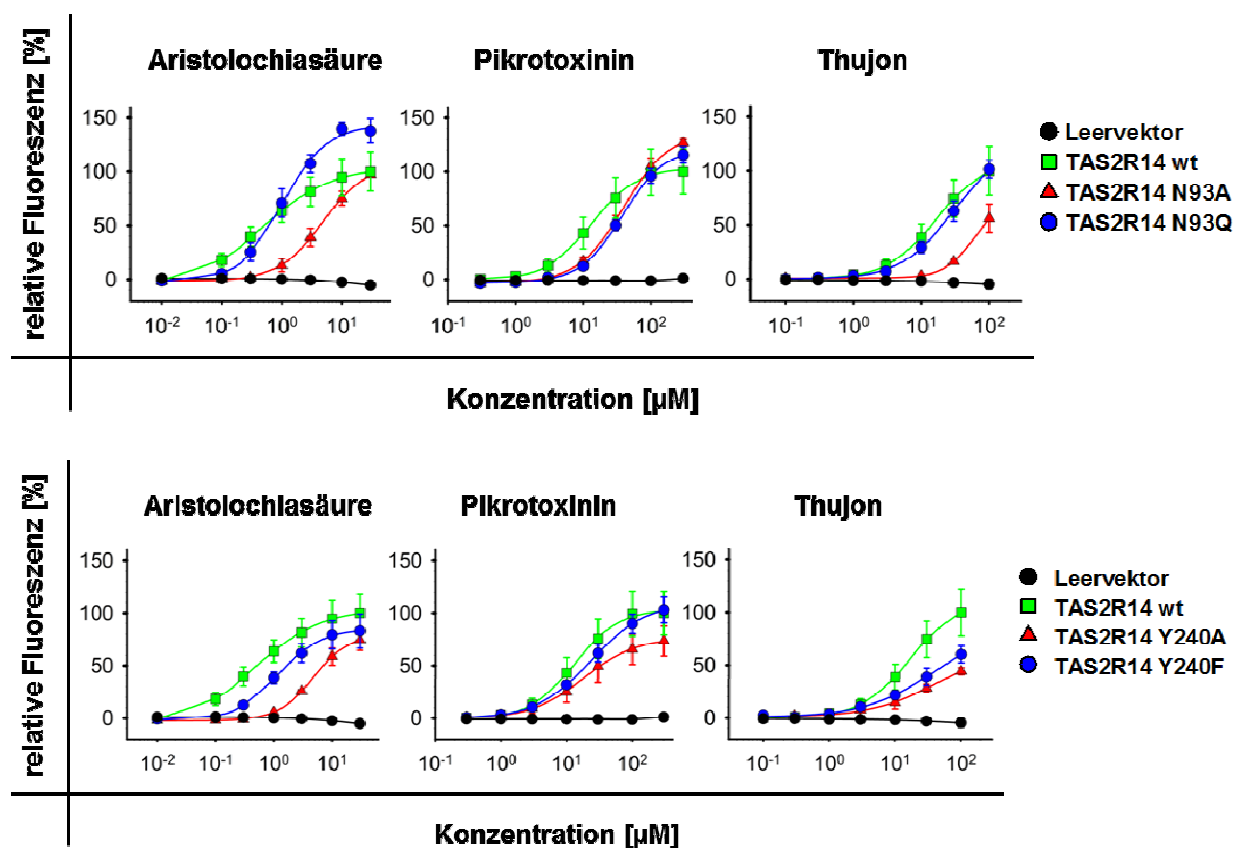


Abbildung 18: Aktivierung der Rezeptormutanten der Positionen **93**<sup>3,36</sup> und **240**<sup>6,48</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmutierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [µM] dargestellt.

Die Rezeptormutante **Y240F**<sup>6,48</sup> wird von Pikrotoxinin mit der gleichen Potenz aktiviert der Wildtyprezeptor (Abbildung 18). Die anderen Testsubstanzen aktivierten den TAS2R14 erst bei einer höheren Konzentration und somit eine Rechtsverschiebungen der Dosis-Wirkungs-

Kurve sichtbar. Bei Pikrotoxinin scheint die fehlende Hydroxylgruppe beim Phenylalanin keinen Effekt auf die Maximalamplitude zu haben, wobei das Fehlen des aromatischen Rings bei Alanin zu einer Verschlechterung führt. Somit ist eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen Pikrotoxinin und der Position **240**<sup>6.48</sup> sehr wahrscheinlich.

Bei Aristolochiasäure und Thujon ist diese Verschiebung bei **Y240F**<sup>6.48</sup> geringer als bei der Rezeptormutante **Y240A**<sup>6.48</sup>. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl der aromatische Ring als auch die Hydroxylgruppe bei der Interaktion von Bedeutung sind. Die Hydroxylgruppe macht Tyrosin weniger hydrophob.

Eine weitere Position wurde sowohl im Bitterrezeptor TAS2R10 **M263**<sup>7.39</sup> (Born et al., 2013) als auch im Rezeptor TAS2R46 **E265**<sup>7.39</sup> für die Agonisteninteraktion identifiziert (Brockhoff et al., 2010). Die homologe Position im TAS2R14 entspricht der **266**<sup>7.39</sup> mit der Aminosäure Glutamin (Q) (Abbildung 19). Bei der Funktionsanalyse der Alaninpunktmutierten Rezeptormutante wurden mögliche Interaktionen mit den Substanzen Pikrotoxinin und Thujon identifiziert. Die Rezeptormutante mit Glutaminsäure (E) an der Position **266**<sup>7.39</sup> zeigte für alle Testsubstanzen eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Die Carboxylgruppe der Glutaminsäure scheint die Interaktion der Substanzen mit der TAS2R14-Bindungstasche an dieser Position zu stören.

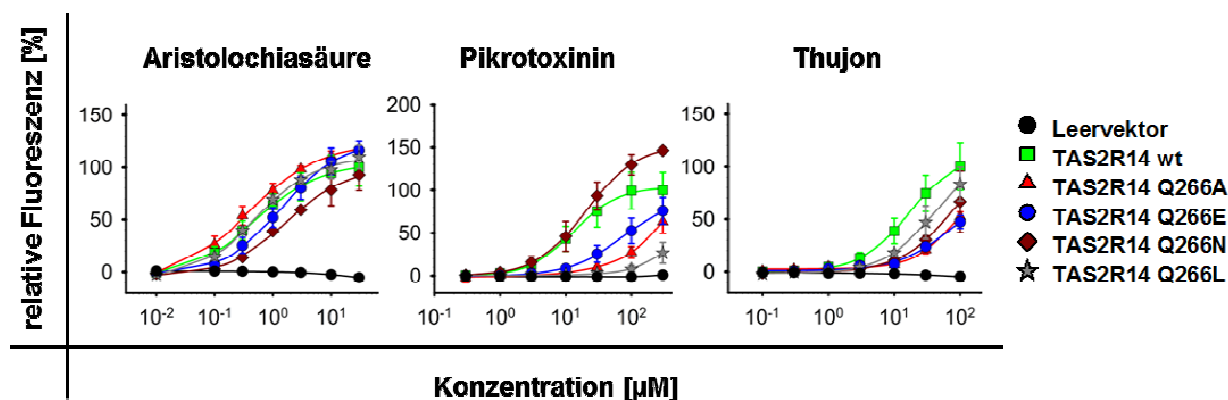


Abbildung 19: Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position **266**<sup>7.39</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmultierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [µM] dargestellt.

Asparagin (N) unterscheidet sich von Glutamin (Q) in der Größe, da es um eine Methylengruppe (CH<sub>2</sub>-Einheit) kürzer ist. Nur im Falle von Pikrotoxinin konnte die Rezeptormutante **Q266N**<sup>7.39</sup> mit gleichem Schwellenwert wie der Wildtyprezeptor aktivieren und erreicht eine höhere Maximalamplitude. Somit kann daraus geschlossen werden, dass

Pikrotoxinin mit der Säureamidgruppe interagiert. Für alle anderen Testsubstanzen scheint die kürzere Seitenkette von Asparagin räumlich ungünstiger verglichen mit Glutamin zu sein, da eine höhere Konzentration notwendig ist, um diese Rezeptormutante zu aktivieren.

Der TAS2R14-Rezeptor mit einem Leucin (L) in der Position **266**<sup>7.39</sup> kann durch Aristolochiasäure wie der Wildtyprezeptor aktiviert werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Leucin sterisch nicht stört und keine Interaktion zur Säureamidgruppe der Wildtypamino­säure existiert.

Die weiterführenden Untersuchungen der Position **266**<sup>7.39</sup> mit der Substanz Thujon zeigte, dass keine der Rezeptormutanten mit der ursprünglichen Stärke aktivieren werden konnte. Somit scheint gerade die Aminosäure Glutamin für die Interaktionsmöglichkeit dieser Position wichtig zu sein.

### 3.1.2.3 Positionen mit möglicher hydrophober Interaktion:

Die Position **269**<sup>7.42</sup> trägt im Wildtyp TAS2R14 ein Glycin (Abbildung 20). Nachdem die Alanin-Rezeptormutane bei allen Testsubstanzen eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve zeigte, wurde ein Isoleucin in die Position **269**<sup>7.42</sup> gebracht.

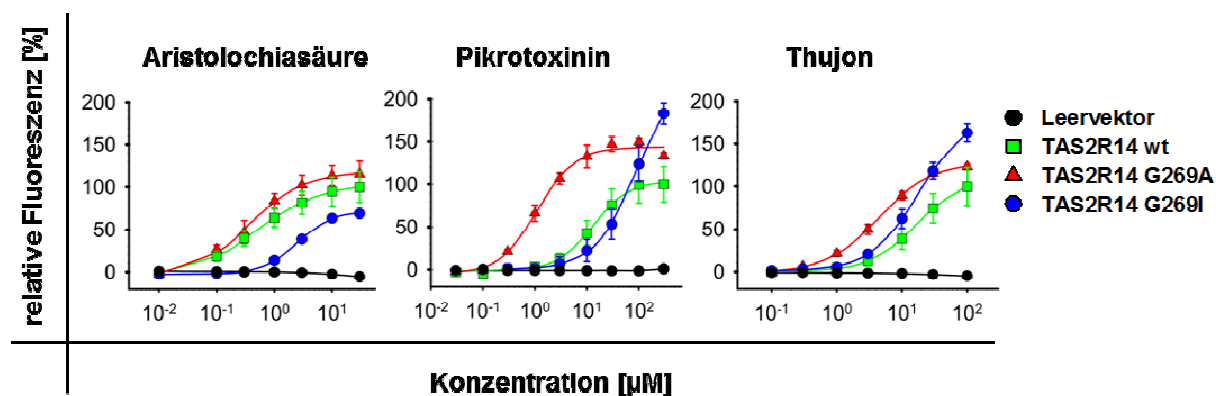


Abbildung 20: Aktivierung der punktmutierten Rezeptorvarianten an der Position **269**<sup>7.42</sup>

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmutierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [µM] dargestellt.

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Isoleucinmutante zeigte für Aristolochiasäure und Pikrotoxinin eine Rechtsverschiebung. Eine größere Aminosäure scheint sich sterisch ungünstig auszuwirken. Erstaunlicherweise zeigte die Dosis-Wirkungs-Kurve mit Pikrotoxinin eine höhere Maximalamplitude.

Thujon aktivierte die Isoleucinmutante mit dem gleichen Schwellenwert wie den Wildtyprezeptor und mit ebenfalls verbesserter Maximalamplitude. Es scheint als profitiert Thujon von unpolaren, aliphatischen Aminosäuren an dieser Position.

Tabelle 4: Funktionelle Charakterisierung detaillierter punktmutierte TAS2R14 Rezeptorvarianten

Bei der funktionellen Charakterisierung der verschiedenen Punktmutanten mit den TAS2R14-Agonisten wurden die Schwellenwerte (TH), die EC<sub>50</sub>-Werte (n.d. = EC<sub>50</sub>-Wert nicht bestimmbar) und die Signalamplituden bei den höchsten gemessenen Konzentrationen (max.A. = maximale Aktivierung) dargestellt. Die maximale Aktivierung wurde mit 30 µM Aristolochiasäure, 300 µM Pikrotoxinin und 100 µM Santonin gemessen und die max.A. wurde auf die Aktivierung des Wildtyprezeptors bezogen.

TAS2 R14	Aristolochiasäure			Pikrotoxinin			α-Thujon		
	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A. [%]	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A. [%]	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A. [%]
Wildtyp	0,1	0,49 ± 0,03	100	3,0	13,16 ± 0,93	100	3,0	17,12 ± 0,43	100
W66F	0,3	0,60 ± 0,04	120	3,0	13,50 ± 1,83	81	1,0	13,78 ± 3,07	94
T86S	0,1	0,47 ± 0,05	107	3,0	18,59 ± 2,24	114	3,0	8,44 ± 1,28	120
T86V	0,1	0,53 ± 0,05	107	-	n.d.	-	3,0	18,48 ± 0,99	102
T86I	0,1	0,34 ± 0,02	109	-	n.d.	-	3,0	21,47 ± 2,36	95
W89F	0,3	0,81 ± 0,13	88	30,0	38,99 ± 2,41	156	1,0	6,70 ± 0,26	119
W89Y	0,3	0,71 ± 0,07	91	0,3	1,93 ± 0,43	106	1,0	3,49 ± 0,31	103
T90I	0,1	0,45 ± 0,05	96	10,0	44,01 ± 2,49	50	3,0	16,65 ± 0,82	90
N93Q	0,3	1,03 ± 0,12	138	10,0	37,53 ± 1,76	115	3,0	30,42 ± 3,30	101
H94E	10,0	n.d.	40	30,0	135,62 ± 29,01	44	100,0	n.d.	20
F186Y	0,3	2,29 ± 0,11	98	3,0	25,70 ± 0,67	132	10,0	33,21 ± 7,87	36
F186L	1,0	3,28 ± 0,17	58	10,0	62,62 ± 8,63	84	100,0	n.d.	33
I187L	0,1	1,11 ± 0,09	86	10,0	25,23 ± 1,19	81	3,0	n.d.	90
I187V	0,1	0,20 ± 0,03	92	100,0	n.d.	37	3,0	40,20 ± 14,39	72
Y240F	0,3	1,19 ± 0,08	83	3,0	23,44 ± 0,39	103	3,0	40,39 ± 17,41	60
F243Y	0,3	2,74 ± 0,77	90	3,0	19,27 ± 0,70	95	3,0	26,40 ± 4,96	136
F247Y	0,3	1,08 ± 0,07	64	-	n.d.	-	10,0	n.d.	66
F247V	0,3	1,44 ± 0,14	66	3,0	9,36 ± 1,06	100	3,0	14,18 ± 2,12	126
Q266E	0,3	1,42 ± 0,11	116	10,0	79,96 ± 6,76	76	10,0	n.d.	47
Q266N	0,3	1,72 ± 0,31	93	3,0	20,61 ± 0,62	146	10,0	82,49 ± 27,00	67
Q266L	0,1	0,51 ± 0,08	110	300,0	n.d.	27	10,0	38,67 ± 2,87	83
G269I	1,0	2,49 ± 0,10	69	30,0	93,14 ± 8,04	183	3,0	18,28 ± 0,79	163

### 3.1.3 Erweiterung des Testsubstanzen-Sets

Nach der Untersuchung der Rezeptormutanten und daraus resultierenden Schlussfolgerungen der Interaktionsart, wurden weitere 4 Agonisten Flufenaminsäure, Genistein, Santonin und Parthenolid als Testsubstanzen eingesetzt (Abbildung 21).

Diese Analyse diente der Aufdeckung möglicher Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen funktionell ähnlichen Agonisten (z. B.: Vollagonisten: Aristolochiasäure und Flufenaminsäure) und unterschiedlichen Agonisten aus einer chemisch verwandten Gruppe (Sesquiterpenlactone: Pikrotoxinin, Santonin und Parthenolid) (Brockhoff, 2009; Meyerhof et al., 2010; Lossow, 2011). Genistein wurde als Vertreter der Isoflavonoide ausgewählt (Roland et al., 2014) und somit ein Vertreter einer weiteren chemischen Gruppe zu den Testsubstanzen hinzugefügt.

Dabei sollten folgende Fragen geklärt werden:

- 1) Binden die untersuchten Agonisten in der gleichen Bindungstasche?
- 2) Verhalten sich die verschiedenen Rezeptormutanten gegenüber den unterschiedlichen Testsubstanzen ähnlich?
- 3) Können die gleichen Wechselwirkungen zu interagierenden Aminosäuren der Bindungstasche bestätigt werden?

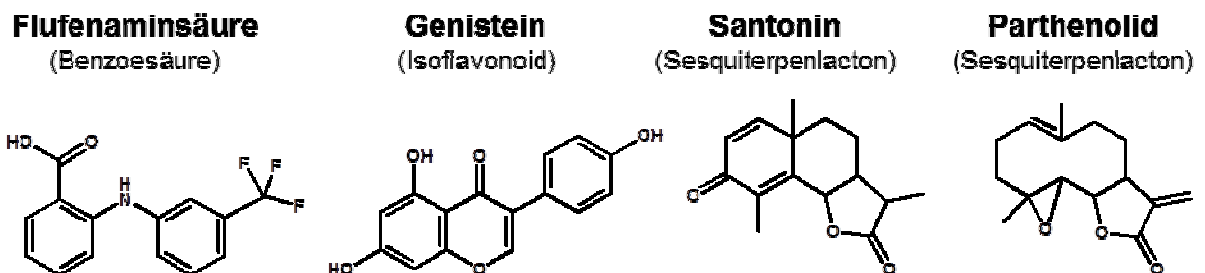


Abbildung 21: erweitertes Testsubstanzen-Set für die funktionelle Untersuchung der TAS2R14-Rezeptormutanten

Dargestellt sind vier Testsubstanzen mit ihren Substanznamen, Substanzgruppen (in Klammern) und den Strukturformeln der Substanzen.

Die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung sind in den Abbildungen 22 und 23 als Dosis-Wirkungs-Kurven dargestellt sowie in den Tabellen 12 und 13 im Anhang (siehe Anhang: 10.9) aufgelistet. Die Auswertungen der Interaktionsarten erfolgt nach den gleichen Kriterien wie im Kapitel 3.1.2 und ist in der Tabelle 5 zusammengefasst.

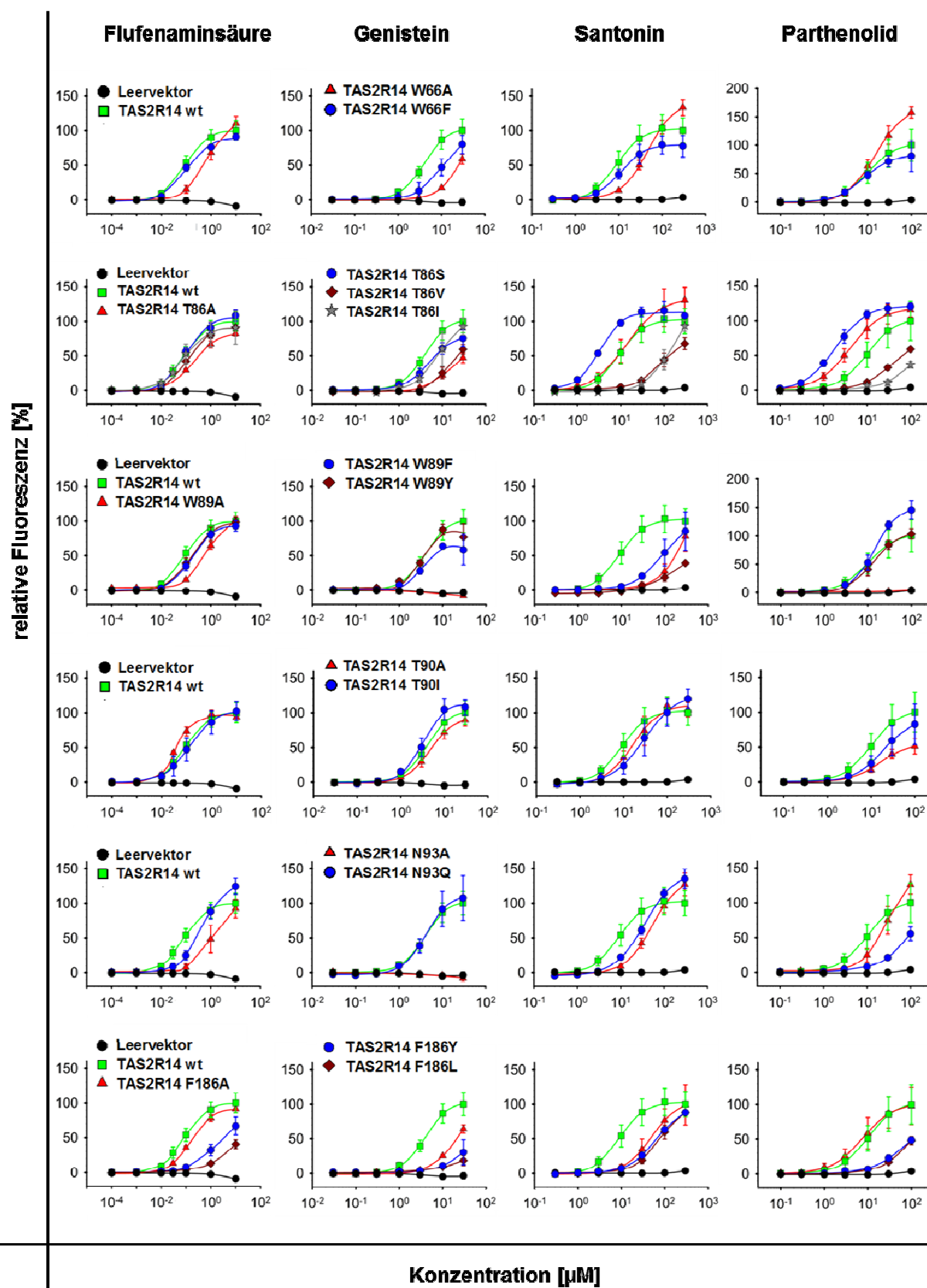


Abbildung 22: Rezeptoraktivierung mit dem erweiterten Testsubstanzen-Set (Teil1)

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmutierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [ $\mu\text{M}$ ] dargestellt.



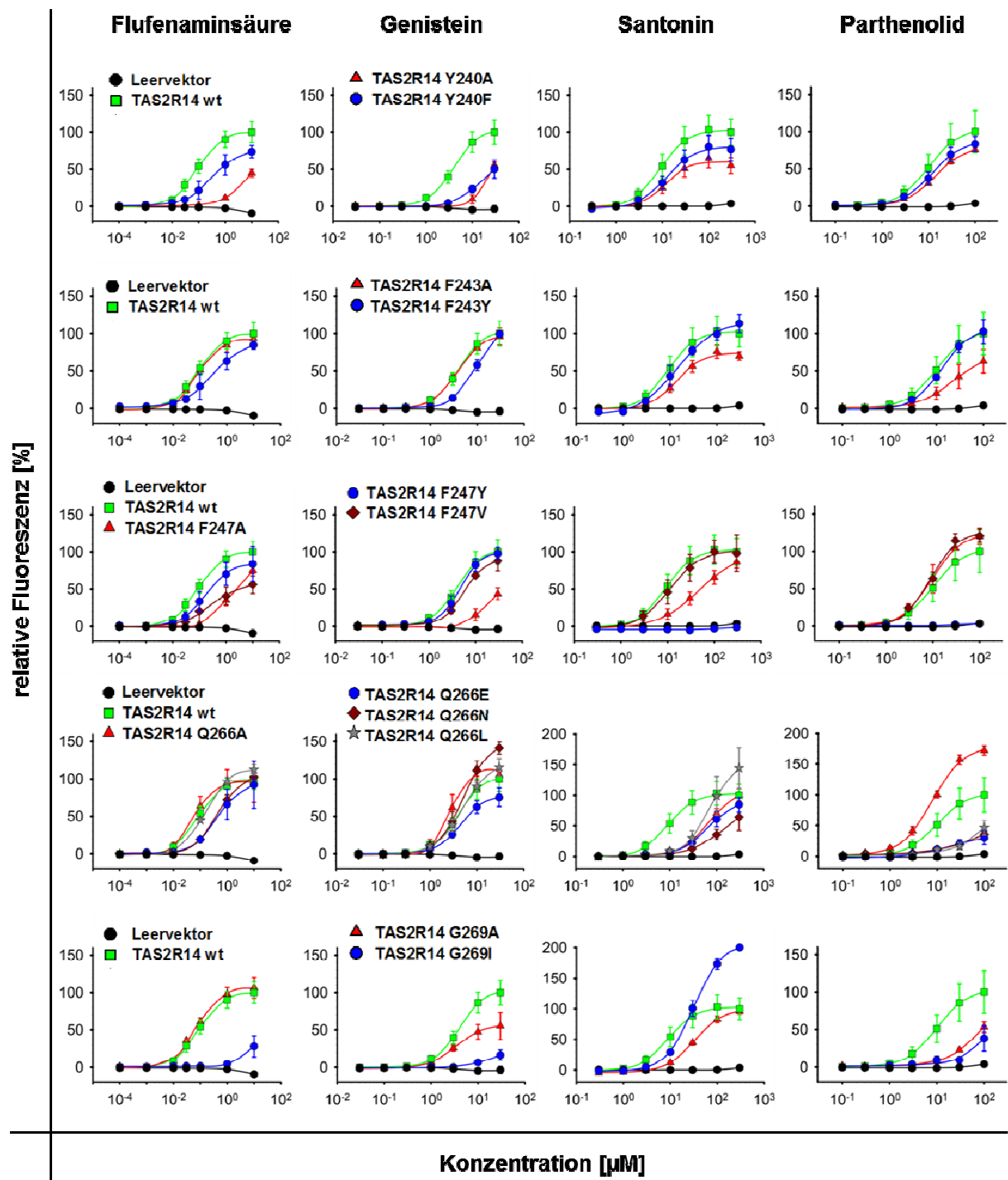


Abbildung 23: Rezeptoraktivierung mit dem erweiterten Testsubstanzen-Set (Teil2)

Dargestellt sind die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Testsubstanzen bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors und der punktmultierten TAS2R14-Rezeptoren. Die Messwerte wurden auf die Amplituden bei den höchsten messbaren Konzentrationen der Messung des Wildtyprezeptors bezogen und als relative Fluoreszenz [%] in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [µM] dargestellt.

### 3.1.3.1 Interaktionsverhalten des Vollagonisten Flufenaminsäure

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede von Vollagonisten zu untersuchen (Hoyer et al., 1993), wurde Flufenaminsäure, als ein zweiter Vollagonist in das erweiterte Testsubstanz-Set mit aufgenommen. Die Ergebnisse der Aktivierung des Rezeptors durch Flufenaminsäure lässt wie bei Aristolochiasäure eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem aromatischen Ring des Tryptophan an der Position **66**<sup>2.61</sup> und der Testsubstanz vermuten. Auch an den Positionen **86**<sup>3.29</sup> (keine oder hydrophobe Wechselwirkung), **89**<sup>3.32</sup> ( $\pi$ -Elektronen-Interaktion oder hydrophobe Wechselwirkung), **93**<sup>3.36</sup> (Wasserstoffbrücken-bindung zur Säureamidgruppe) und **240**<sup>6.48</sup> ( $\pi$ -Elektroneninteraktion mit weniger Hydrophobizität als bei Phenylalanin) scheinen die beiden Vollagonisten in gleicher Art mit den Aminosäureresten zu interagieren. Bei beiden Substanzen besteht keine Interaktion zu den Positionen **90**<sup>3.33</sup> und **266**<sup>7.39</sup>. Abweichende Interaktionsarten zeigt Flufenaminsäure im Vergleich zu Aristolochiasäure zu den Positionen: **186**<sup>5.46</sup> (keine Interaktion / vermutete  $\pi$ -Elektronen-Interaktion), **247**<sup>6.55</sup> (vermutete  $\pi$ -Elektronen-Interaktion / eher hydrophobe Interaktion) und **269**<sup>7.42</sup> (keine Interaktion / hydrophobe Interaktion).

Die zwei Vollagonisten Aristolochiasäure und Flufenaminsäure aktivierten die verschiedenen Rezeptormutanten sehr ähnlich und grenzen sich deutlich von den Partialagonisten ab.

### 3.1.3.2 Interaktionsverhalten der Sesquiterpenlactone

Nach der Analyse von Pikrotoxinin wurden noch zwei weitere Agonisten aus der chemischen Gruppe der Sesquiterpenlactone, Santonin und Parthenolid, ausgewählt.

Bei neun Positionen zeigen immer zwei, aber nie die gleichen Sesquiterpenlactone, eine ähnliche Aktivierung (bei den Aminosäuren **W66**<sup>2.61</sup>, **T86**<sup>3.29</sup>, **F247**<sup>6.55</sup> und **Q266**<sup>7.39</sup> (Pikrotoxinin / Santonin); **W89**<sup>3.32</sup>, **T90**<sup>3.33</sup>, **N93**<sup>3.36</sup> und **F186**<sup>5.46</sup> (Pikrotoxinin / Parthenolid), **F243**<sup>6.51</sup> (Santonin / Parthenolid)). Daraus kann geschlossen werden, dass die zugrunde liegende Wechselwirkung an einer Position nicht bei allen Sesquiterpenlactonen gleich sind.

Obwohl die drei Substanzen zu den Sesquiterpenlactonen gehören, hat jede einzelne Substanz ihr eigenes Interaktionsprofil in der Bindungstasche. Vergleicht man den Aufbau der Sesquiterpenlactone, so ist auffällig, dass sie trotz der Gemeinsamkeiten (bestehend aus drei Isopreneinheiten (15 Kohlenstoffatome) und Lactonring), eine relativ heterogene Gruppe darstellen.

### 3.1.3.3 Interaktionsverhalten Genistein

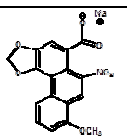
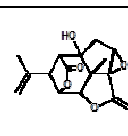
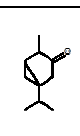
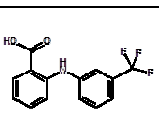
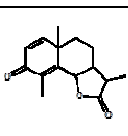
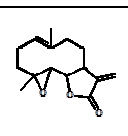
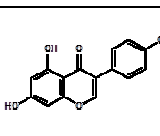
Die Untersuchungen der Rezeptormutanten mit Genistein zeigten ein ähnliches Aktivierungsmuster wie die Vollagonisten Aristolochiasäure und Flufenaminsäure (**W66**<sup>2.61</sup> und **W89**<sup>3.32</sup> =  $\pi$ -Elektronen-Interaktionen oder hydrophobe Wechselwirkungen; **T90**<sup>3.33</sup>, **F243**<sup>6.51</sup> und **Q266**<sup>7.39</sup> = keine Interaktion; **N93**<sup>3.36</sup> = Wasserstoffbrückenbindung; **Y240**<sup>6.48</sup> =  $\pi$ -Elektronen-Interaktionen) und lassen daher auf ähnliche Wechselwirkung schließen.

Wie Pikrotoxinin, Thujon und Santonin zeigen die Untersuchungen des TAS2R14 mit Genistein eine mögliche hydrophobe Wechselwirkung zur Aminosäure **F247**<sup>6.55</sup> (Leucinmutante wie Wildtyp aktiviert).

Der Bindungsmodus von Genistein ähnelt, trotz klarer Unterschiede, stärker den Modi von Flufenaminsäure und Aristolochiasäure als dem der Sesquiterpenlactone. Trotzdem ist Genistein nur ein Partialagonist, das heißt, Genistein fehlt eine entscheidende strukturelle und/oder chemische Voraussetzung, um den Rezeptor maximal bzw. vollständig aktivieren zu können.

Tabelle 5: Mögliche Interaktionsarten zwischen den Aminosäuren und dem jeweiligen Agonist

Angegeben sind die möglichen Interaktionsarten beruhend auf der Struktur der Aminosäuren und der Agonisten basierend auf den Ergebnissen der funktionellen Untersuchungen der einzelnen Punktmutanten. Es wurden folgende Symbole verwendet:  $\pi$ - $\pi$  = Interaktion zweier aromatischer Ringe,  $\pi$ -OH = Interaktion eines aromatischen Rings mit den  $\pi$ -Elektronen einer Hydroxylgruppe,  $\text{NH}_2\text{-O} / \text{NH}_2\text{-OH} // \text{O-OH}$  = Wasserstoffbrückenbindung, - = keine Interaktion, H = Hydrophobe Wechselwirkung, S = sterischer Effekt (Gruppe der AS wird zuerst benannt, z.B. „ $\pi$ -OH“ bedeutet, dass der = aromatische Ring („ $\pi$ “) der AS mit der Hydroxylgruppe („OH“) des Agonisten interagiert) n.d. = nicht eindeutig bestimmbar.

AS	Aristolochia-säure	Pikrotoxinin	Thujon	Flufenamin-säure	Santonin	Parthenolid	Genistein
							
W66 <sup>2.61</sup>	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H	$\pi$ -OH/ H	$\pi$ -O/ H	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H	$\pi$ - $\pi$ / H +S	-	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H +S
T86 <sup>3.29</sup>	- /H	OH-O	-	- /H	OH-O/ -	-	n.d.
W89 <sup>3.32</sup>	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H +S	$\pi$ -O	$\pi$ -O/ H	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H +S	$\pi$ -OH +S/ $\text{NH}_2$ -OH	$\pi$ -OH	$\pi$ - $\pi$
T90 <sup>3.33</sup>	-	OH-HO /H	-	-	-	OH-OH / H +S	- / S
N93 <sup>3.36</sup>	$\text{NH}_2$ -OH/ O- OH	- /+S	$\text{NH}_2$ - O+S	$\text{NH}_2$ -OH/ O- OH +S	$\text{NH}_2$ -OH +S	- /+S	$\text{NH}_2$ -OH/ O-OH
F186 <sup>5.46</sup>	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ +S	-	$\pi$ -O	-	$\pi$ -O + S	-	$\pi$ -OH + S
Y240 <sup>6.48</sup>	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H +S	H/ +S	OH-O/ S	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ / H +S		-	OH- $\pi$ / $\pi$ - $\pi$ /H +S
F243 <sup>6.51</sup>	-	- /+S	- / S	-	$\pi$ -O/ $\pi$ - $\pi$ / H	$\pi$ -O/ $\pi$ - $\pi$ / H	-
F247 <sup>6.55</sup>	H +S	H	H +S	$\pi$ -OH/ $\pi$ - $\pi$ +S	H	-	H
Q266 <sup>7.39</sup>	-	$\text{NH}_2$ -O	$\text{NH}_2$ -O	-	$\text{NH}_2$ -O O- $\pi$	-	-
G269 <sup>7.42</sup>	nah	S	H / S	-	H / S	H / S	-

### 3.1.4 Überprüfung der Bindungsmodi der verschiedene Agonisten mittels Docking-Modell-Analyse

Docking-Modelle und deren Analyse ermöglicht eine Vorhersage über die Lage und Ausrichtung eines Agonisten in der Bindungstasche eines Rezeptors. Zur Erstellung werden die Aminosäurereste so in Position gebracht, dass die wahrscheinlichste, energieärmste Konformation angenommen wird. Dabei werden die möglichen Wechselwirkungen (Beschreibung der möglichen Wechselwirkungen siehe Kapitel: 3.1.2) und Bindungsabstände berücksichtigt.

Die Bindungsabstände hängen von der Art der Interaktion ab. Bei Wasserstoffbrückenbildungen wurde zwischen einem Sauerstoffmolekül der Hydroxylgruppe und dem Wasserstoffmolekül der Aminogruppe ein Abstand von maximal 2,5 Å festgestellt (Baker et al., 1984). Bei Wasserstoffbrückenbindungen zu aromatischen  $\pi$ -Elektronen-Akzeptoren liegt der Abstand zwischen den interagierenden Molekülen bei 3,2 - 3,8 Å (Steiner et al., 2001; Steiner et al., 1998). Bei einer  $\pi$ - $\pi$ -Elektronen-Interaktion zwischen zwei Benzenmolekülen, die exakt gleich ausgerichtet sind, liegt ein Abstand von 3,0 Å vor (Huber et al., 2014). Bei einer Anionen- $\pi$ -Elektronen-Interaktion wurde zwischen dem Zentrum eines aromatischem Rings und dem Stickstoff des Nitratanions ein Abstand von 3,5 Å (Zaccheddu, 2008) und zum Sauerstoff ~ 3,65 Å (Gotz et al., 2008) festgestellt.

Hydrophobe Wechselwirkungen können zwischen aliphatischen unpolaren Aminosäuren und unpolaren Teilen des Agonistenmoleküls mit einem Abstand von 3.8 bis 9.5 Å auftreten (Onofrio et al., 2014).

Nachdem die ersten wichtigen Positionen der TAS2R14-Bindungstasche identifiziert waren, wurden Docking-Modelle in Kooperation mit Masha Niv und Anat Levit (The Hebrew University of Jerusalem, Israel) mit dem Programm Discovery-Studio-3.1 (Accelrys Inc.) mit dem flexiblen Docking-Algorithmus erstellt. Nach der fortschreitenden Analyse verschiedener Rezeptormutanten entstanden im iterativen Prozess weitere Docking-Modelle bis zu den finalen Modellen für alle 7 Testsubstanzen (Abbildungen 24 - 28, 30 und 31).

Zur Darstellung wurde das Programm Pymol (Schrödinger LLC) verwendet. Bei den Modellen wurde der Rezeptor in Grau dargestellt. Das Gerüst der gedockten Agonisten ist immer Grün und wichtige Aminosäuren in Gelb gekennzeichnet. Einzelne Atome von funktionellen Gruppen sind ebenfalls farblich markiert (Sauerstoff rot, Fluor hellblau, Wasserstoff weiß und Stickstoff mittelblau).

### 3.1.4.1 Docking-Modelle der Vollagonisten (Aristolochiasäure und Flufenaminsäure)

Bei der Erstellung des überarbeiteten Docking-Modells für Aristolochiasäure zeigten die Nitrogruppe und Carbonsäuregruppe der Aristolochiasäure Richtung Bindungstaschengrund (Abbildung 24). Die Carbonsäuregruppe der Aristolochiasäure ist mit 2,0 Å von der Aminosäure **N93**<sup>3,36</sup> entfernt und kann somit eine Wasserstoffbrückenbindung eingehen, welches durch die funktionellen Untersuchungen gestützt wird.

Die Nitrogruppe kann mit einem Abstand von 3,0 Å eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zur Position **247**<sup>6,55</sup> und zur Position **89**<sup>3,32</sup> mit einem Abstand von 1,4 Å eine Wasserstoffbrückenbindung aufbauen. Die Punktmutanten **W89F**<sup>3,32</sup> und **W89Y**<sup>3,32</sup> zeigen gegenüber der Alaninmutante eine bessere Aktivierung, auch wenn keine der Mutanten eine dem Wildtyp-vergleichbare Aktivierung erreichen konnte. Daraus ergibt sich eine zusätzliche  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zwischen der Position **89**<sup>3,32</sup> und einem aromatischen Ring der Aristolochiasäure mit 3,3 Å (Ring-C oder -D).

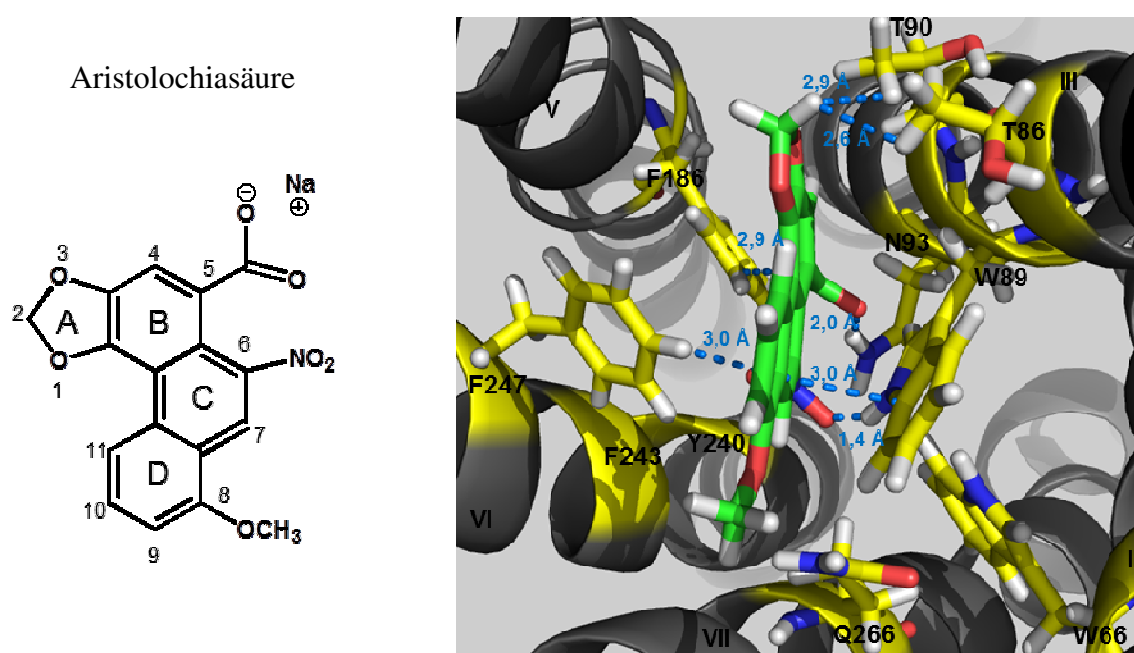


Abbildung 24: Docking-Modell Aristolochiasäure

Dargestellt sind links die Strukturformel der Testsubstanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

Die Methoxygruppe der Aristolochiasäure befindet sich in räumlicher Nähe zu **Q266**<sup>7,39</sup> mit einem Abstand von 2,3 Å. Laut den funktionellen Daten ist **Q266**<sup>7,39</sup> aber kein direkter Interaktionspartner. Der Ring-A der Aristolochiasäure zeigt in Richtung **T86**<sup>3,29</sup> und **T90**<sup>3,33</sup>

mit einem Abstand von 2,6 und 2,9 Å. Die beiden Aminosäuren werden nicht direkt kontaktiert, jedoch wirkt sich die hydrophobe Auskleidung durch die Methylgruppen positiv aus.

Die Position **186**<sup>5,46</sup> ist bei dem finalen Modell mit 2,9 Å näher an Aristolochiasäure und kann somit eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion mit der Ketogruppe eingehen.

Die Aminosäure **W66**<sup>2,61</sup> und **Y240A**<sup>6,48</sup> befinden sich in diesem Modell nicht in direkter Interaktion mit Aristolochiasäure. Die funktionellen Daten zeigen eine veränderte Aktivierung der Punktmutanten durch Aristolochiasäure, wodurch ein intramolekularer Effekt innerhalb des Rezeptors über  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zwischen **W89**<sup>3,32</sup> bzw. **F186**<sup>5,46</sup> mit je 2,7 Å Abstand eine mögliche Ursache sein könnte.

Im Docking-Modell von Flufenaminsäure zeigt der Ring-A in Richtung Bindungstaschengrund und liegt zwischen **F186**<sup>5,46</sup> und **F247**<sup>6,55</sup> (Abbildung 25). Laut den funktionellen Untersuchungen interagiert Flufenaminsäure über die  $\pi$ -Elektronen mit **F247**<sup>6,55</sup>, welche im Modell mit einem Abstand von 3,6 Å möglich ist. Die Carbonsäuregruppe von Flufenaminsäure hat eine Wasserstoffbrückenbindung zur Aminosäure **N93**<sup>3,36</sup> (1,9 Å) und **W89**<sup>3,32</sup> (1,8 Å).

Flufenaminsäure

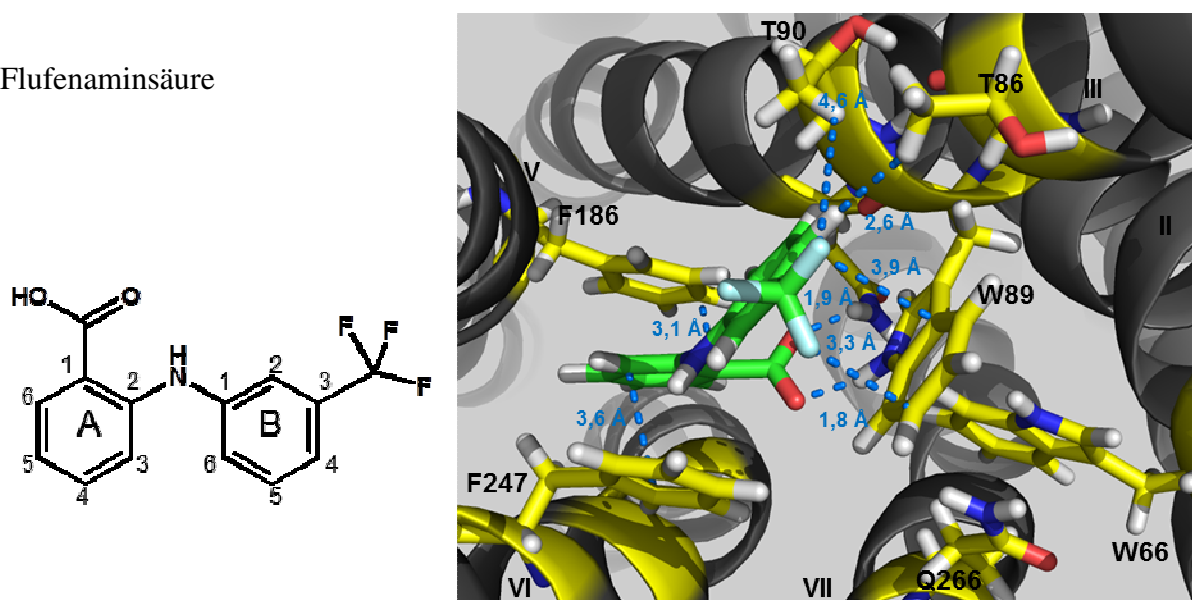


Abbildung 25: Docking-Modell von Flufenaminsäure

Dargestellt sind links die Strukturformel der Tests substanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

Auch bei Flufenaminsäure gibt es keine direkte Interaktion zu den Aminosäure **W66**<sup>2,61</sup> und **Y240A**<sup>6,48</sup>. Der Ring-B zeigt in Richtung Bindungstascheneingang und interagiert mit **W89**<sup>3,32</sup> über  $\pi$ -Elektronen (3,9 Å). Die Methylgruppe der Aminosäure **T86**<sup>3,29</sup> befindet sich im Abstand von 2,6 Å und bietet dem Ring-B eine hydrophobe Auskleidung der Bindungstaschennische.

### 3.1.4.2 Docking der Sesquiterpenlactone (Pikrotoxinin, Santonin, Parthenolid)

Das Docking von Pikrotoxinin ergab ein Modell, in dem Pikrotoxinin in der Bindungstasche zwischen den Aminosäuren **T86**<sup>3,29</sup> (5,3 Å), **W89**<sup>3,32</sup> (2,4 / 3,6 Å), **T90**<sup>3,33</sup> (1,9 / 3,8 Å), **N93**<sup>3,36</sup> (3,5 Å), **F247**<sup>6,55</sup> (3,9 Å) und **Q266**<sup>7,39</sup> (2,0 Å) liegt (Abbildung 26).

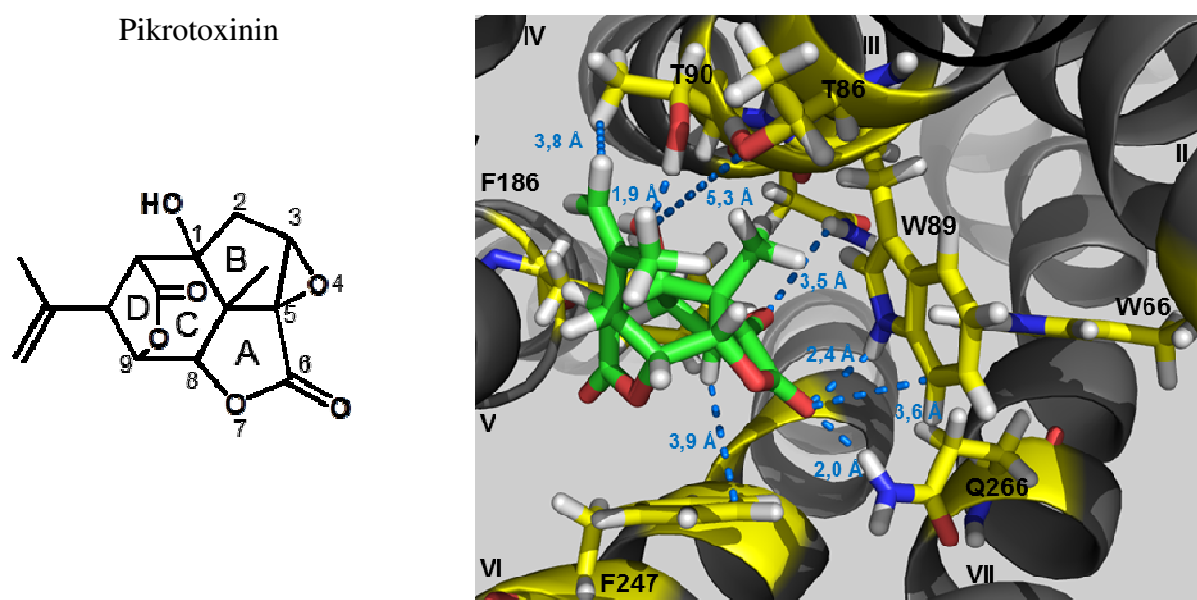


Abbildung 26: Docking-Modelle von Pikrotoxinin

Dargestellt sind links die Strukturformel der Testsubstanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

Das Tryptophan der Position **89**<sup>3,32</sup> hat einen Abstand von 2,4 Å zur Ketogruppe des Ring-A vom Pikrotoxinins, wodurch eine Wasserstoffbrückenbindung möglich ist. Zum aromatischen Ring des Tryptophans hat das Pikrotoxinin einen Abstand von 3,6 Å, welches eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion möglich macht. Die funktionelle Untersuchung der Punktmutanten zeigte, dass die Rezeptormutante **W89F**<sup>3,32</sup> durch den Agonisten Pikrotoxinin sehr gut, mit einer kleinen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, aktiviert werden kann. Die Maximalamplitude von 158 % bei einer Konzentration von 300  $\mu$ M entspricht einem  $\Delta F/F$ -



Wert von  $1,05 \pm 0,04$ . Solch eine hohe Aktivierung des TAS2R14 wird sonst nur bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors durch Vollagonisten erreicht.

Phenylalanin (F) hat jedoch eine unpolare Seitenkette und bietet nicht die Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung. Somit kommt eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion in Frage, eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Tryptophan im Wildtyprezeptor kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für die Positionen **90**<sup>3.33</sup> (3,8 Å) und **247**<sup>6.55</sup> (3,9 Å) zeigen die funktionellen Untersuchungen eine mögliche hydrophobe Wechselwirkung. Zusätzlich scheint Pikrotoxinin mit der Hydroxylgruppe des Threonins der Position **90**<sup>3.33</sup> in Wechselwirkung zu stehen, was laut Modell mit einem Abstand von 1,9 Å möglich ist. Die Untersuchungen der Mutanten zeigten weiterhin eine Interaktion zur Säureamidgruppe der Position **266**<sup>7.39</sup>, welche auch im Modell mit einem Abstand von 2,0 Å gestützt wird.

Die funktionellen Daten zeigten, dass die Hydroxylgruppe des Threonins für die Interaktion zwischen der Position **86**<sup>3.29</sup> und Pikrotoxinin von Bedeutung ist. Im Modell ist die Hydroxylgruppe des Threonins mit 5,3 Å zu weit entfernt, um direkt eine Interaktion mit Pikrotoxinin einzugehen. Wenn man Pikrotoxinin im Modell näher an die Position **86**<sup>3.29</sup> bringt, vergrößert sich der Abstand zu **266**<sup>7.39</sup>, wodurch dann diese Interaktion nicht mehr möglich ist. Die Interaktion zur Aminosäure **T86**<sup>3.29</sup> ist jedoch indirekt über **T90**<sup>3.33</sup> möglich, somit kann dieses Modell als Darstellung der tatsächlichen Situation in der Bindungstasche angesehen werden.

### Docking von Santonin

Im Docking-Modell liegt Santonin zwischen den gleichen Aminosäureresten (**T86**<sup>3.29</sup> (1,8 Å), **W89**<sup>3.32</sup> (3,8 Å), **T90**<sup>3.33</sup> (2,3 Å), **N93**<sup>3.36</sup> (2,3 Å), **F186**<sup>5.46</sup> (3,0 Å), **F243**<sup>6.51</sup> (3,0 Å), **F247**<sup>6.55</sup> (3,0 Å) und **Q266**<sup>7.39</sup> (5,1 Å)) wie Pikrotoxinin (Abbildung 27). Dabei ist der Lactonring des Santonins der Aminosäure **T86**<sup>3.29</sup> zugewandt und hat einen Abstand von 1,8 Å. Die funktionellen Daten zeigen, dass Santonin die Alaninmutante wie den Wildtyp aktivieren. Der Rezeptor mit Serin an der Position **86**<sup>3.29</sup> wird sogar durch geringere Santoninkonzentrationen aktiviert. Die Rezeptormutanten **T86V**<sup>3.29</sup> und **T86I**<sup>3.29</sup> werden schlechter aktiviert und liefern den Hinweis, dass sich Santonin tatsächlich in der Nähe dieser Position befindet.

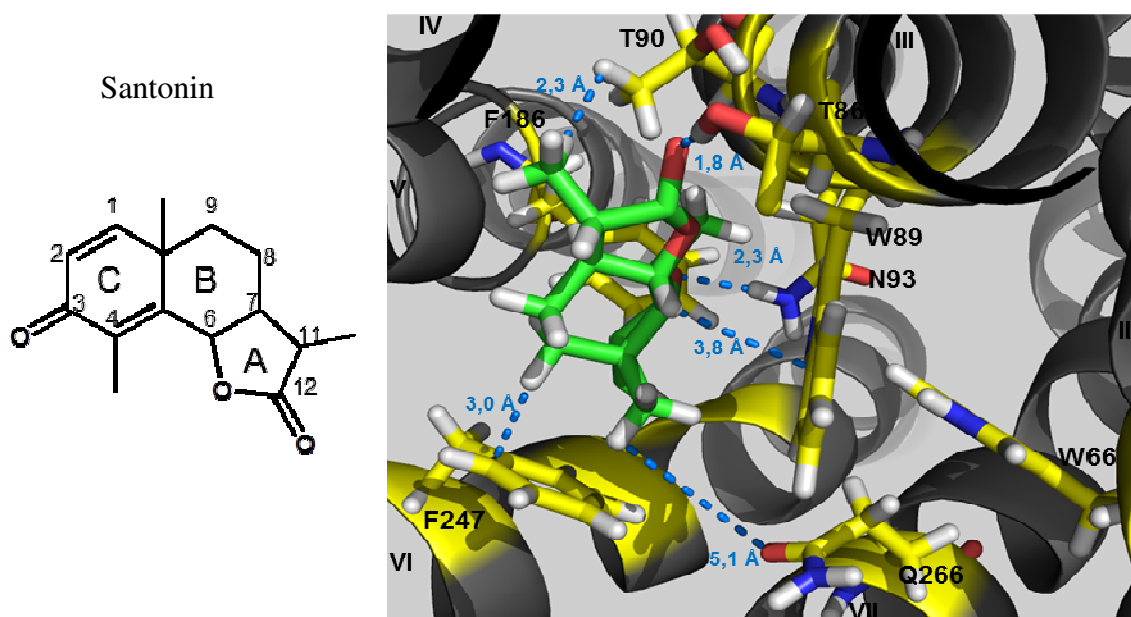


Abbildung 27: Docking-Modelle von Santonin

Dargestellt sind links die Strukturformel der Testsubstanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

Der Ring-B interagiert mit der Position **247**<sup>6,55</sup> gemäß funktioneller Daten über eine hydrophobe Wechselwirkung. Die Ketogruppe des Ring-C liegt zwischen den Positionen **93**<sup>3</sup> und **186**<sup>5,46</sup>, wodurch eine Wasserstoffbrückenbindung mit 2,3 Å zum Asparagin (N) und eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion mit 3,0 Å zum Phenylalanin (F) möglich sind und durch die funktionellen Daten gestützt werden. Die Position **90**<sup>3,33</sup> ist im Modell mit 2,3 Å nah am Santonin und könnte mit der Kohlenstoffseitenkette des Threonins eine hydrophobe Interaktion zur Methylgruppe des Santonins eingehen.

Auch die Position **266**<sup>7,39</sup> ist an der Interaktion zum Santonin beteiligt. Jedoch ließ sich die Interaktionsart nicht eindeutig bestimmen, da alle Punktmutanten der Position **266**<sup>7,39</sup> eine verschlechterte Aktivierung zeigten und somit ein funktioneller Zusammenhang nicht hergestellt werden konnte.

### Docking von Parthenolid

*In silico* befindet sich Parthenolid zwischen den Aminosäuren **T86**<sup>3,29</sup> (3,4 Å), **W89**<sup>3,32</sup> (2,1 und 4,0 Å), **T90**<sup>3,33</sup> (2,7 Å), **N93**<sup>3,36</sup> (4,5 Å), **F186**<sup>5,46</sup> (6,6 Å), **F243**<sup>6,51</sup> (3,8 Å und 5,0 Å), **F247**<sup>6,55</sup> (3,4 Å) und **Q266**<sup>7,39</sup> (3,3 Å) im Bindungstaschenmodell (Abbildung 28). Zwischen der Methylgruppe des Parthenolids und der Methylgruppe des Threonins der Position **T90**<sup>3,33</sup> mit einem Abstand von 2,7 Å scheint eine hydrophobe Wechselwirkung vorzuliegen. Die

Aminosäure **F243**<sup>6,51</sup> hat im Modell einen Abstand von 5,0 Å zur Methylengruppe des Parthenolids und kann somit eine hydrophobe Wechselwirkung eingehen. Des Weiteren ist die Ketogruppe des Laktonrings 3,8 Å entfernt und somit ist eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion möglich. Beide Interaktionsarten sind basierend auf den funktionellen Daten möglich. Zu den Positionen **T86**<sup>3,29</sup> (3,4 Å), **F186**<sup>5,46</sup> (6,6 Å), **F247**<sup>6,55</sup> (3,4 Å) und **Q266**<sup>7,39</sup> (3,3 Å) besteht keine Interaktion, aber sie befinden sich in der Nähe.

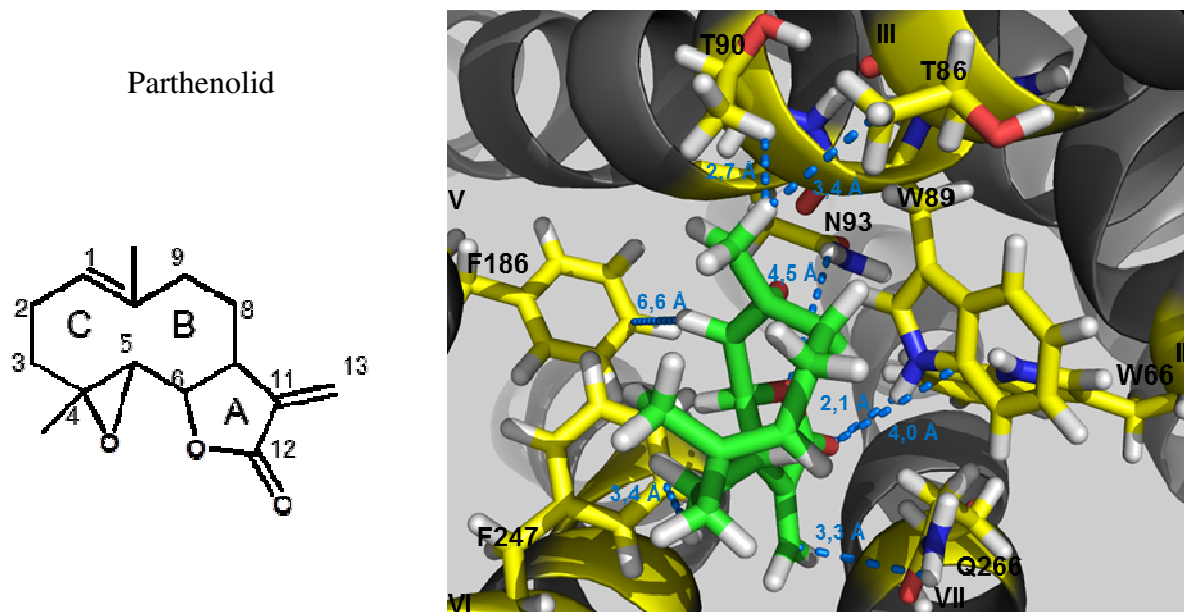


Abbildung 28: Docking-Modelle von Parthenolid

Dargestellt sind links die Strukturformel der Testsubstanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

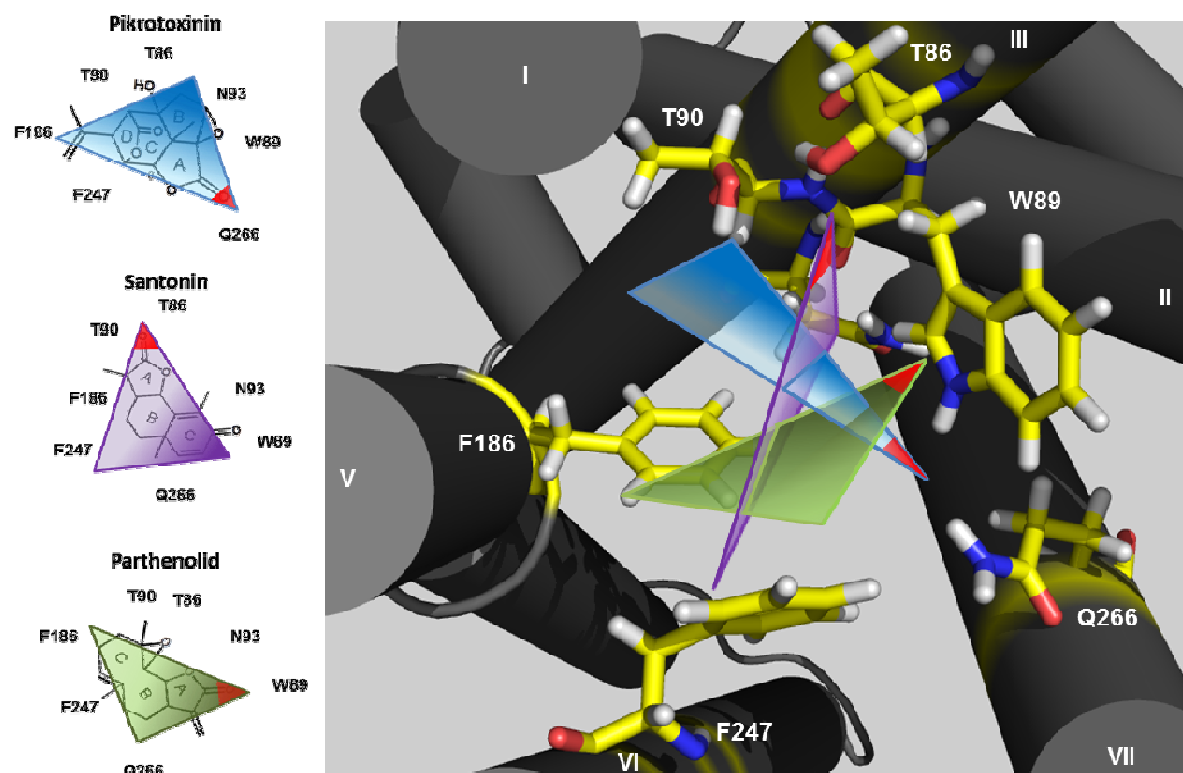


Abbildung 29: Ausrichtung der Sesquiterpenlactone in der Bindungstasche

Dargestellt sind die drei getesteten Sesquiterpenlactone mit ihren Strukturformeln (links). Das rechte Bild zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 als Zylindermodell mit gelb markierten Aminosäuren, welche die Bindungstasche auskleiden. In der Bindungstasche wurden Pikrotoxinin in Blau, Santonin in Lila und Parthenolid in Grün als planare Dreiecke skizzenhaft eingezeichnet. Die rote Spitze markiert das Keton des Lactonrings und markiert somit die Ausrichtung der Substanzen.

Obwohl die Substanzen Pikrotoxinin, Santonin und Parthenolid zu einer chemischen Gruppe, den Sesquiterpenlactonen, gehören, ist in den Dockingmodellen keine gleiche Ausrichtung zu erkennen (Abbildung 29). Der doppelgebundene Sauerstoff des Lactonrings des Pikrotoxinins zeigt in Richtung **Q266**<sup>7,39</sup>, bei Santonin in Richtung **T86**<sup>3,29</sup> und bei Parthenolid zur Aminogruppe von **W89**<sup>3,32</sup>.

### 3.1.4.3 Weitere partielle Agonisten

Ein weiterer partieller, strukturell kleiner Agonist ist Thujon, welcher sich im Docking-Modell zwischen den Positionen **T86**<sup>3,29</sup> (4,8 Å), **W89**<sup>3,32</sup> (1,8 / 3,7 Å), **T90**<sup>3,33</sup> (4,5 Å), **N93**<sup>3,36</sup> (4,5 Å), **F186**<sup>5,46</sup> (3,2 Å), **F247**<sup>6,55</sup> (3,7 Å) und **Q266**<sup>7,39</sup> (2,1 Å) befindet (Abbildung 30). Sowohl das Modell als auch die funktionellen Daten deuten auf eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zu den Positionen **89**<sup>3,32</sup> und **186**<sup>5,46</sup> sowie eine Wasserstoffbrücken zur Position **266**<sup>7,39</sup> hin.

Die Aminosäuren **T86**<sup>3.29</sup>, **T90**<sup>3.33</sup> und **F247**<sup>6.55</sup> befinden sich in der Nähe des Thujons, scheinen aber nicht mit der Substanz zu interagieren.

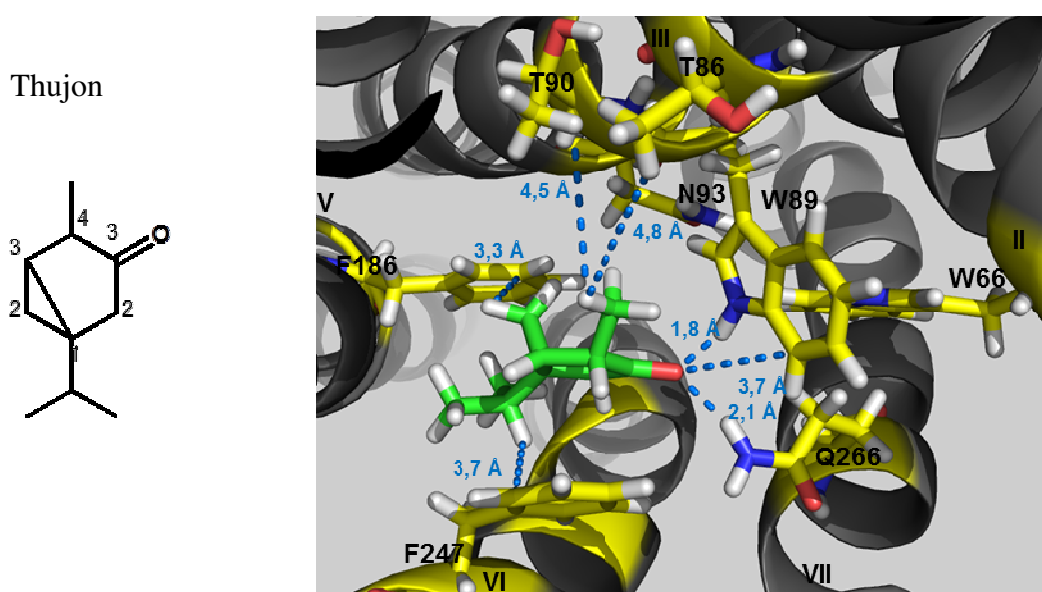


Abbildung 30: Docking-Modelle von Thujon

Dargestellt sind links die Strukturformel der Testsubstanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

Auch Genistein liegt zwischen **T86**<sup>3.29</sup> (2,6/ 3,9 Å), **W89**<sup>3.32</sup> (3,5 Å), **T90**<sup>3.33</sup> (2,9 Å), **N93**<sup>3.36</sup> (2,7 Å), **F186**<sup>5.46</sup> (4,2 Å), **F247**<sup>6.55</sup> (3,3 Å) und **Q266**<sup>7.39</sup> (4,9 Å) (Abbildung 31). Im Gegensatz zu Thujon scheint Genistein mit **T86**<sup>3.29</sup> zu interagieren. Im Modell ist sowohl eine hydrophobe Wechselwirkung (3,9 Å) also auch eine Wasserstoffbrückenbindung (2,6 Å) möglich.

Die Analyse der Punktmutanten an der Position **89**<sup>3.32</sup> lässt auf eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zwischen aromatischen Ringen schließen, welche im Modell mit einem Abstand von 3,5 Å zwischen Tryptophan und dem Ring-C des Genisteins möglich ist.

Der Rezeptor kann im gleichen Maße aktiviert werden; egal ob sich die Wildtypaminoäure Asparagin (N) oder Glutamin (Q) an der Position **93**<sup>3.36</sup> befindet. Daraus lässt sich schließen, dass die Säure-Amid-Gruppe von Bedeutung ist und somit eine Wasserstoffbrückenbindung in Frage kommt. Diese Interaktionsart ist im Modell mit einem Abstand von 2,7 Å möglich.

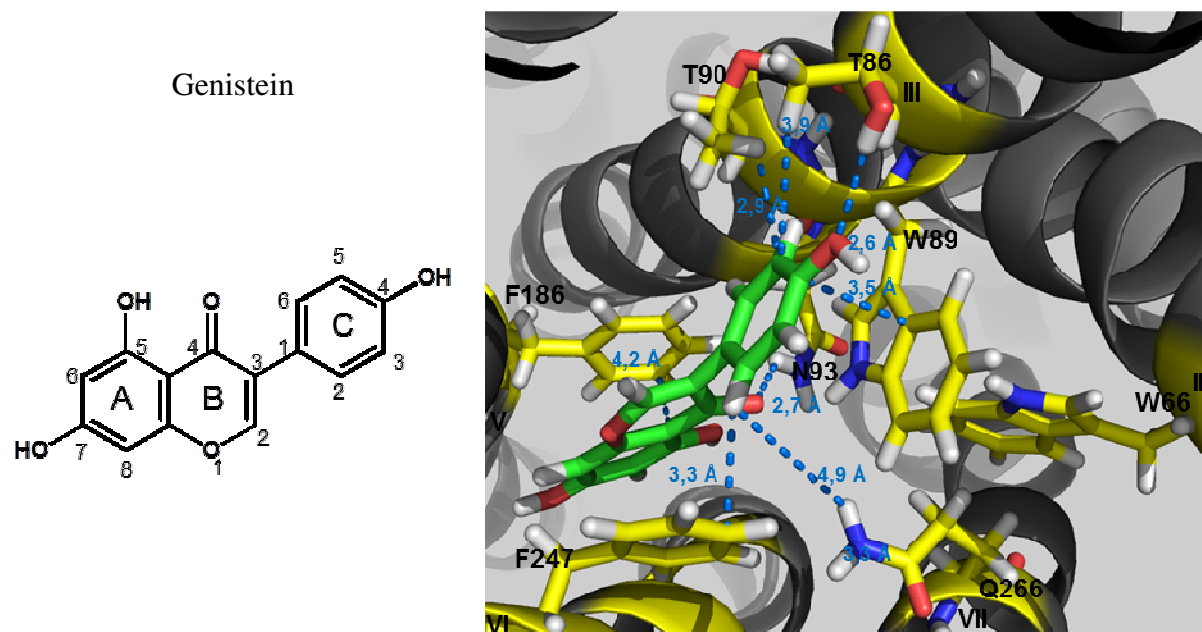


Abbildung 31: Docking-Modelle von Genistein

Dargestellt sind links die Strukturformel der Testsubstanz und rechts das dazugehörigen Docking-Modell. Das Docking-Modell zeigt die Aufsicht in die Bindungstasche des TAS2R14 (grau = Transmembrandomänen mit römischen Zahlen nummeriert, gelb = untersuchte Aminosäuren, grün = gedockte Substanz; blau = Abstandsmessungen in Ångström).

### 3.1.5 Bedeutung der extrazellulären Schleifen

Bereits 2004 zeigte Pronin, dass extrazellulären Schleifen eine Bedeutung für das Agonistenspektrum von TAS2R-Familie haben können (Pronin et al., 2004). Er übertrug die extrazellulären Schleifen des TAS2R43, entspricht hT2R61, auf den nah verwandten Rezeptor TAS2R31, entspricht hT2R64, und zeigte die Aktivierung des TAS2R31 mit dem TAS2R43-Agonisten 6-Nitrosaccharin. Die Rezeptoren TAS2R31 und TAS2R43 weisen eine Aminosäureübereinstimmung von 89,3 % (Identity) und eine 95,5 %ige Ähnlichkeit (Similarity) auf.

Der nächste verwandte Rezeptor des TAS2R14 ist der TAS2R13, jedoch haben sie eine wesentlich geringere Aminosäureübereinstimmung von 46,7 % (Identity) und 63,6 % Ähnlichkeit (Similarity).

N-Terminus		
<b>TAS2R13</b>	(1)	ME <sup>S</sup> SALPSIFTLVIIAEFIIIGNLSNGFIVLINCIDWVSKRELSSVDKLLII
<b>TAS2R14</b>	(1)	MGGVIKSIFTFVLIVEFIIIGNLNSFIALVNCIDWVKGRKISSVDRLITA
TAS2R14 AS Nr		1 3
ECL1		
<b>TAS2R13</b>	(51)	LAISRIGLIWEILVSWFLALHYLAIFVSGTGLRIMIFSWIVSNHFNWLWA
<b>TAS2R14</b>	(51)	LAISRISLVWLIFGSWCVSVF <sup>F</sup> PALFAT <sup>E</sup> EKMFRMLTNIWTVINHFSVWLA
TAS2R14 AS Nr		66 72 78 86 89/90 93/94
<b>TAS2R13</b>	(101)	TIFSIFYLLKIASFSSPAFLYLKWRVNVILMILLGTLVFLFLNLIQINM
<b>TAS2R14</b>	(101)	TGLGTFYFLKIANFNSIFLYLKWRVKKVVLVLLLVT <sup>S</sup> VFLFLNIALINI
TAS2R14 AS Nr		149
ECL2		
<b>TAS2R13</b>	(151)	HIKDWLDRYERNTTWNFSMSDFETF <sup>S</sup> SVSVKFTMTMFSLTPFTVAFISFLL
<b>TAS2R14</b>	(151)	HINASINGYRRNKTCSSDSNFTR <sup>F</sup> SSLIVLTSTVFI <sup>F</sup> IPFTLSLAMFLL
TAS2R14 AS Nr		175 186
<b>TAS2R13</b>	(201)	LIFSLQKHLQMQLNKGRDPRTKVHTNALKIVISFLLFYASFFLCVLI
<b>TAS2R14</b>	(201)	LIFSMWKRKMQHTVKISGDASTKAHR-GVKSVITFFLLYAIFSLSFFI
TAS2R14 AS Nr		240 243 247
ECL3		
<b>TAS2R13</b>	(251)	SWISELYQNTVIYMLCETIGVFS <sup>S</sup> SSHSFLLILGNAKLRQAFLLVAAKVV
<b>TAS2R14</b>	(250)	SVWISERLEENLIILSQVMGMAYPSCHSCVLI <sup>L</sup> GNKKLRQASLSVLLWLR
TAS2R14 AS Nr		253 260 266 269
<b>TAS2R13</b>	(301)	AKR-----
<b>TAS2R14</b>	(300)	YMFKDGEPGSGHKEFRESS

Abbildung 32: Vergleich der TAS2R13 und TAS2R14 Sequenzen

Die Lage der extrazellulären Bereiche (N-Terminus und extrazelluläre Schleifen (ECL)) wurde grau hinterlegt. Des Weiteren wurden die identifizierten Aminosäuren der TAS2R14 Bindungstasche markiert. Dabei wurden die zwischen TAS2R13 und TAS2R14 konservierten Positionen in der Farbe Magenta hinterlegt und die unterschiedliche Positionen in Hellblau.

Der TAS2R14 zeichnet sich durch sein breites Agonistenspektrum aus, wohingegen beim TAS2R13 nur zwei Agonisten bekannt sind und dieser somit zu den Rezeptoren mit einem sehr engen Spektrum gehört. Die Aktivierungsstärke des TAS2R13 mit seinen Agonisten, Denatoniumbenzoat und Diphenidol, im heterologen Expressionssystem, ist verglichen mit der Aktivierung des TAS2R14 durch Aristolochiasäure oder Flufenaminsäure, jedoch wesentlich geringer (ca. 1/10 Effizienz).

Ziel war es, die strukturellen Unterschiede zwischen breiten und eng eingestellten Rezeptoren herauszuarbeiten.

Um eine räumliche Vorstellung von der potentiellen Bindungstasche des TAS2R13 zu bekommen, wurde ein Homologiemodell des TAS2R13 auf der Grundlage des Aminosäuresequenz-Vergleichs beider Rezeptoren und dem TAS2R14-Homologiemodell, erstellt.

Die Abgrenzung der extrazellulären Schleifen zu den Transmembrandomänen des TAS2R13 und TAS2R14 erfolgte durch die Analyse der Homologiemodelle der beiden Rezeptoren, durch die Vorhersage der 2D-Struktur mit dem PSI-PRED Algorithmus (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Die extrazellulären Bereiche, N-Terminus (1 – 3 AS), ECL1 (72 – 78 AS), ECL2 (149 – 175 AS) und ECL3 (TAS2R14: 253 – 260 AS, TAS2R13: 254 – 261 AS), wurden in der Abbildung 32 dargestellt und wurden über mehrere Mutagenese-Schritte (siehe Anhang 10.6) ausgetauscht.

Diese Chimären wurden funktionell im heterologen Expressionssystem auf ihre Funktionalität geprüft (TAS2R13-Konstrukte siehe Kapitel: 3.1.5.1 und TAS2R14-Mutanten siehe Kapitel: 3.1.5.2).

### **3.1.5.1 Funktionelle Ergebnisse der Chimäre des TAS2R13-Rezeptors mit den extrazellulären Schleifen des TAS2R14**

Zunächst stellte sich die Frage, ob die Übertragung von Schleifen eines Rezeptors mit breitem Agonistenspektrum auf einen Rezeptor mit engem Agonistenspektrum den Zugang für weitere Agonisten schafft und somit sich das Agonistenspektrum vergrößern würde.

Um diese Frage beantworten zu können, wurden TAS2R13-Mutanten mit den einzelnen TAS2R14 extrazellulären Bereichen (TAS2R13\_NTerm, TAS2R13\_ECL1, TAS2R13\_ECL2, TAS2R13\_ECL3) und einem TAS2R13 Rezeptor mit allen extrazellulären Bereichen des TAS2R14 (TAS2R13\_NTerm\_ECL123) hergestellt. Die unterschiedlichen TAS2R13 Rezeptorchimären wurden mit den beiden TAS2R13-Agonisten, Denatoniumbenzoat und



Diphenidol, sowie wie TAS2R14-Agonisten, Aristolochiasäure, Flufenaminsäure, Pikrotoxinin und Santonin, gemessen.

Alle TAS2R13-Rezeptorchimären mit extrazellulären Schleifen des TAS2R14 verloren die Aktivierbarkeit durch die TAS2R13-Agonisten und konnten durch keinen TAS2R14-Agonisten aktiviert werden. Um eine fehlende Aktivierbarkeit durch mangelnde Expression auszuschließen, wurde die Expressionseffizienz überprüft. Die Untersuchung ergab für die TAS2R13-Chimäre mit der ECL2 von TAS2R14 eine verschlechterte Expression ( $0,6 \pm 0,6 \%$ ) verglichen zum TAS2R13 Wildtyprezeptor ( $4,9 \pm 2,0 \%$ ) (siehe Anhang 10.10: Abbildung 59). Somit kann dies ein Grund für die fehlende Aktivierung sein. Die Messung der Chimäre mit ECL3 des TAS2R14 hingegen zeigt sogar eine bessere Expression mit  $14,1 \pm 5,1 \%$  als der TAS2R13 Wildtyprezeptor und ist mit der TAS2R14-Wildtyprezeptorexpression mit  $14,4 \pm 3,4 \%$  vergleichbar. Alle anderen TAS2R13-Chimären hatten ähnliche Expressionraten wie der Wildtyprezeptor TAS2R13. Trotz der guten Expression, mit Ausnahme der Chimäre mit der ECL2 des TAS2R14, verloren die veränderten Rezeptoren die Fähigkeit aktiviert zu werden.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die TAS2R14-Schleifen den Zugang für TAS2R13-Agonisten behindern und die Bindungstasche nicht für TAS2R14-Agonisten optimiert ist oder die Modifikation zu einer Fehlfaltung des Rezeptor geführt hat und somit die Bindungstasche nicht intakt ist. Dieses Ergebnis spricht für die Nutzung des Konstrukts mit dem unveränderten TAS2R13-Gen (Wildtyp) als Ausgangspunkt für die Punktmutagenese des TAS2R13, um das TAS2R14-Agonistenspektrum zu übertragen (Kapitel: 3.1.6).

### **3.1.5.2 Funktionelle Ergebnisse der Chimäre des TAS2R14-Rezeptors mit den extrazellulären Schleifen des TAS2R13**

Zur Prüfung, ob die extrazellulären Schleifen des TAS2R13 den Zugang für TAS2R14-Agonisten behindert, wurden TAS2R14-Rezeptorchimären, welche die einzelnen TAS2R13 ECLs tragen (TAS2R14\_NTerm, TAS2R14\_ECL1, TAS2R14\_ECL2, TAS2R14\_ECL3) und ein TAS2R14-Rezeptorchimären mit allen TAS2R13-extrazellulären Bereichen (N-Terminus und allen ECLs, TAS2R14\_NTerm\_ECL123) hergestellt.

Die verschiedenen TAS2R14-Rezeptorchimären wurden mit den zwei Vollagonisten, (Aristolochiasäure und Flufenaminsäure) und den drei Partialagonisten aus der chemischen Gruppe der Sesquiterpenlactone (Pikrotoxinin, Santonin und Parthenolid) gemessen (Abbildung 33, Tabelle 6).

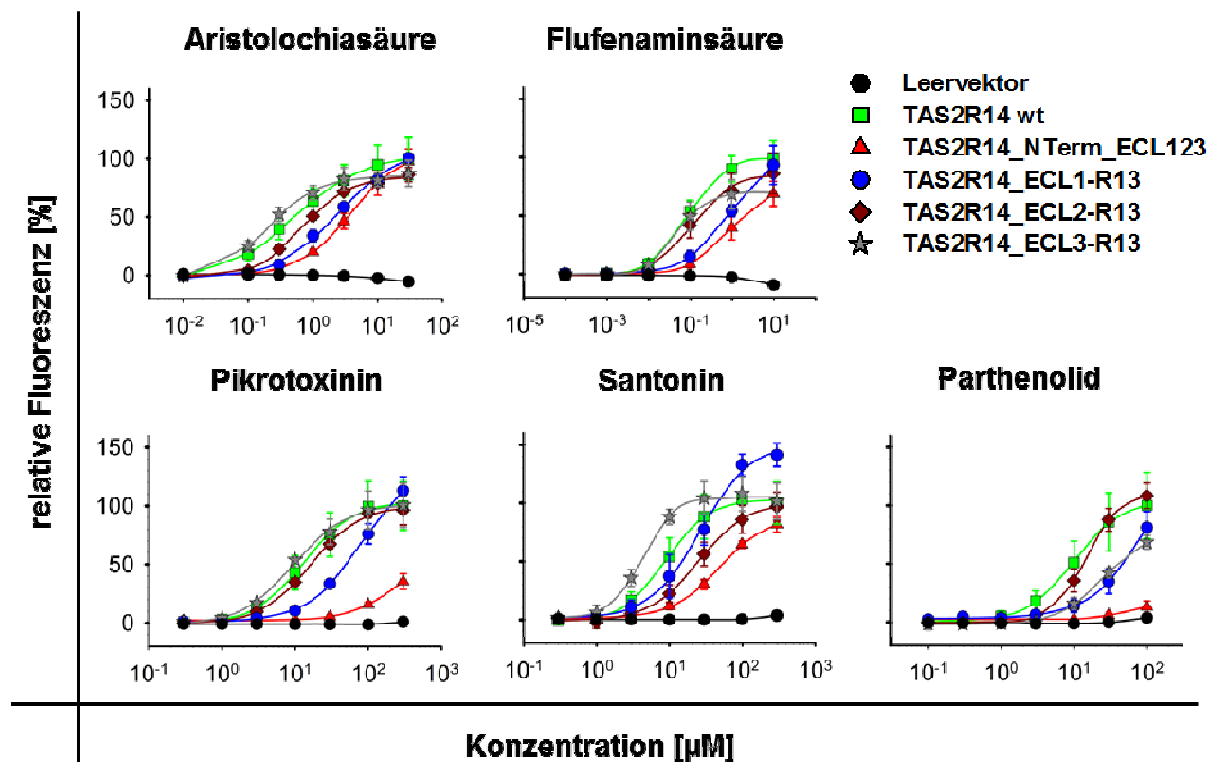


Abbildung 33: TAS2R14 Rezeptorchimären mit extrazellulären Schleifen des TAS2R13

Die punktmutierten TAS2R14 Rezeptoren wurden mit fünf Agonisten (Aristolochiasäure, Flufenaminsäure, Pikrotoxinin, Santonin und Parthenolid) auf ihre dosisabhängige Aktivierbarkeit getestet. Dargestellt ist jeweils die relative Fluoreszenz [%] bezogen auf die maximale Aktivierung des unveränderten TAS2R14 Rezeptors (Wildtyp) der entsprechenden Substanz in Abhängigkeit von der Konzentration der Testsubstanz [µM].

Bei dem Austausch aller extrazellulären Bereiche (TAS2R14\_NTerm\_ECL123) kommt es bei allen fünf Testsubstanzen zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve mit signifikant geringerer Aktivierung bei der höchsten messbaren Konzentration der Testsubstanzen. Nur im Falle von Aristolochiasäure konnte bei der höchsten messbaren Konzentration die maximale Amplitude des Wildtyps erreicht werden. Jedoch zeichnet sich der Trend ab, dass bei höheren Konzentrationen auch bei den anderen Agonisten möglicherweise die Maximalamplitude wie bei der Aktivierung des Wildtyprezeptors TAS2R14 erreicht werden kann. Die Messung mit Parthenolid zeigt die schlechteste Aktivierbarkeit der veränderten TAS2R14-Rezeptormutanten, dabei wurde eine Aktivierung nur knapp signifikant über der Messung der mit Leervektor transfizierten Zellen gemessen. Da für die anderen Substanzen eine agonistenspezifische Aktivierung des TAS2R14 möglich ist bzw. mit höherer Konzentration möglich scheint, kann daraus geschlossen werden, dass die Bindungstasche durch den Austausch der extrazellulären Schleifen nicht verändert wurde. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass die extrazellulären Schleifen des TAS2R13 den Zugang zur Bindungstasche für Parthenolid fast komplett blockieren.

Da der Zugang durch die extrazellulären Schleifen des TAS2R13 für die Testsubstanzen, mit Ausnahme von Parthenolid, nur wenig gestört war, wurde für die Übertragung der relevanten Positionen der TAS2R14-Bindungs tasche auf den TAS2R13 das Wildtyp-Konstrukt des TAS2R13 als Ausgangspunkt für die Mutagenese benutzt (Kapitel: 3.1.6).

Tabelle 6: Funktionelle Charakterisierung des TAS2R14 mit den extrazellulären Schleifen (ECLs) des TAS2R13

Bei der funktionellen Charakterisierung mit den TAS2R14-Agonisten wurden die Schwellenwerte (TH), die EC<sub>50</sub>-Werte (n.d. = EC<sub>50</sub>-Wert nicht bestimmbar) und die Signalamplituden bei den höchsten gemessenen Konzentrationen (max.A. = maximale Aktivierung) dargestellt.

TAS2R14-Konstrukt	Aristolochiasäure			Flufenaminsäure		
	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A.bei 30µM [%]	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A.bei 10µM [%]
Wildtyp	0,10	0,49 ± 0,03	100	0,01	0,08 ± 0,01	100
TAS2R14_NTerm_ECL123	0,30	3,98 ± 0,22	98	0,10	0,88 ± 0,09	69
TAS2R14_ECL1	1,00	2,50 ± 0,48	101	0,10	0,98 ± 0,07	94
TAS2R14_ECL2	0,30	0,69 ± 0,07	86	0,10	0,12 ± 0,03	86
TAS2R14_ECL3	0,10	0,19 ± 0,02	87	0,01	0,05 ± 0,01	72
TAS2R14-Konstrukt	Pikrotoxinin			Santonin		
	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A.bei 300µM [%]	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A.bei 300µM [%]
Wildtyp	3,00	13,16 ± 0,93	100	3,00	9,03 ± 0,62	100
TAS2R14_NTerm_ECL123	100,00	223,54 ± 84,88	36	10,00	50,02 ± 2,64	81
TAS2R14_ECL1	10,00	85,02 ± 4,83	113	10,00	26,64 ± 3,46	141
TAS2R14_ECL2	3,00	16,26 ± 1,04	96	10,00	24,83 ± 1,95	97
TAS2R14_ECL3	3,00	9,63 ± 0,92	100	3,00	4,28 ± 0,29	102
TAS2R14-Konstrukt	Parthenolid			TAS2R14-Konstrukt	Expressions-effizienz	
	TH [µM]	EC <sub>50</sub> [µM]	max. A.bei 100µM [%]			
Wildtyp	1,00	10,27 ± 0,25	100	Wildtyp	14,4 ± 3,4	
TAS2R14_NTerm_ECL123	100,00	n.d.	13	TAS2R14_NTerm_ECL123	11,2 ± 2,1	
TAS2R14_ECL1	10,00	107,54 ± 48,53	81	TAS2R14_ECL1	16,0 ± 1,6	
TAS2R14_ECL2	10,00	14,92 ± 0,28	108	TAS2R14_ECL2	11,5 ± 1,0	
TAS2R14_ECL3	10,00	26,01 ± 2,28	69	TAS2R14_ECL3	15,5 ± 4,0	

Die funktionelle Analyse der TAS2R14-Rezeptorchimären mit dem Austausch nur einer extrazellulären Schleife ergaben weitere agonistenspezifische Ergebnisse. Der Austausch der ersten ECL zeigt für alle Substanzen eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve und für Santonin eine erhöhte Maximalamplitude.

Parthenolid konnte die TAS2R14-Rezeptorchimäre mit dem ECL2 des TAS2R13 im gleichen Maße wie den TAS2R14-Wildtyprezeptor aktivieren. Für die anderen Substanzen wurde eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve festgestellt. Die dritte extrazelluläre Schleife des TAS2R13 beeinflusste die Aktivierung des TAS2R14 sehr unterschiedlich. Für

Pikrotoxinin und Parthenolid gab es eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, bei Flufenaminsäure war die maximale Amplitude vermindert und für Aristolochiasäure und Santonin zeichnete sich sogar eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve ab. Die Bestimmung der Expressionseffizienz zeigt eine vergleichbare Expression der einzelnen Chimären verglichen mit der Expression des TAS2R14-Wildtyprezeptors (siehe Tabelle 6 und Anhang 10.10 Abbildung 58). Das bedeutet die funktionellen gemessenen Unterschiede entstehen nicht durch abweichende Rezeptorexpression, sondern durch reine strukturelle Unterschiede der Rezeptorchimären.

### 3.1.6 Wechselseitige Übertragung einzelner Aminosäurereste zwischen den Rezeptoren TAS2R14 und seinem nahen verwandten Bitterrezeptor TAS2R13

Nachdem die homologen Positionen von TAS2R13 und -R14 im Aminosäure-Sequenzalignment verglichen wurden (Abbildung 32), stellte sich die Frage, ob und wie stark die abweichenden TAS2R13-Aminosäurereste des Rezeptors die notwendige Aktivierungspotenz und die Aktivierungseffizienz der TAS2R14-Agonisten beeinflussen und ob die Änderung einzelner Aminosäuren der TAS2R13 Bindungstasche zur Übertragung des Agonistenspektrums des TAS2R14 beitragen können.

#### 3.1.6.1 Übertragung von TAS2R13-Aminosäureresten auf den TAS2R14

Zunächst wurden die abweichenden TAS2R13-Aminosäurereste durch jeweils einzelne Punktmutationen durch TAS2R14-Aminosäurereste ersetzt (**Q266E**<sup>7.39</sup>, **F247V**<sup>6.55</sup>, **T86I**<sup>3.29</sup> und **T90I**<sup>3.33</sup>) und die Funktionalität der einzelnen Rezeptormutanten gemessen. Diese Messungen wurden bereits im Abschnitt (3.1.2) bei den weiterführenden Punktmutationsanalysen zu den einzelnen Positionen diskutiert und in Abschnitt 3.1.3 weitergeführt untersucht.

Die funktionelle Untersuchung der Mutante **Q266E**<sup>7.39</sup> zeigte eine generelle Verschlechterung der Aktivierung, welches in der Abbildung 19 als Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve darstellt.

Bei der Rezeptormutante **F247V**<sup>6.55</sup> ist die Aktivierung bei vier Agonisten verschlechtert, jedoch für drei Substanzen ist eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve erkennbar (Abbildung 15 und Abbildung 23). Die Abbildung 16 und Abbildung 22 zeigen für die TAS2R14-Mutante **T86I**<sup>3.29</sup> eine verschlechterte Aktivierung für alle Substanzen außer den beiden Vollagonisten (Aristolochiasäure und Flufenaminsäure). Die Punktmutation **T90I**<sup>3.33</sup> wirkt sich ebenfalls ungünstig auf die Aktivierbarkeit durch Pikrotoxinin aus (Abbildung 17 und Abbildung 22). Somit konnten mehrere Positionen identifiziert werden, welche

möglicherweise einen Einfluss auf die Breite des Agonistenspektrums haben könnten. Daher wurden die ausgewählten Aminosäuren schrittweise durch Mutagenese auf den TAS2R13-Wildtyprezeptor übertragen.

### 3.1.6.2 Übertragung von TAS2R14-Aminosäureresten auf den TAS2R13

Nachdem die ersten Untersuchungen der Übertragung der TAS2R13-Aminosäurereste auf den TAS2R14 eine verschlechterte Aktivierbarkeit des TAS2R14 zeigten, wurde mit dem Austausch von **E267Q**<sup>7,39</sup> im TAS2R13-Rezeptor begonnen.

Die TAS2R13- **E267Q**<sup>7,39</sup> Mutante wurde im Vergleich zur TAS2R13-Wildtyprezeptor mit den zwei TAS2R13-Agonisten, Denatoniumbenzoat und Diphenidol, und den TAS2R14-Agonisten, Aristolochiasäure, Pikrotoxinin und Santonin, gemessen.

Die TAS2R13-Mutante **E267Q**<sup>7,39</sup> konnte durch TAS2R13-Agonisten nicht mehr aktiviert werden. Da kein Funktionsgewinn der TAS2R13-Mutante **E267Q**<sup>7,39</sup> mit den TAS2R14-Agonisten verzeichnet werden konnte, wurde als nächstes die Position **247**<sup>6,55</sup> von Valin nach Phenylalanin in der TAS2R13-Mutante **E267Q**<sup>7,39</sup> mutiert. Die Messung zeigte einen Verlust der Aktivierung durch TAS2R13-Agonisten und keinen Gewinn von Aktivität durch TAS2R14-Agonisten. Auch der zusätzliche Austausch von **I86T**<sup>3,29</sup> brachte keinen Aktivierungsgewinn durch TAS2R14-Agonisten. Alle diese Mutanten zeigten eine Expressionsrate, welche mit der Expression des TAS2R13-Wildtyprezeptor vergleichbar ist und somit kann der Funktionsverlust durch TAS2R13-Agonisten und das fehlende Aktivierungsgewinn durch TAS2R14-Agonisten auf Grund von mangelnder Expression des Rezeptors ausgeschlossen werden (siehe Anhang 10.9, Abbildung 60). Anschließend wurde die Position **90**<sup>3,33</sup> punktmuiert (**I90T**<sup>3,33</sup>), aber auch diese Übertragung der TAS2R14 Aminosäure der Position zeigte keinen positiven Effekt.

Durch den Austausch der vier unterschiedlichen Aminosäuren der Bindungstaschen konnten die Agonistenspektren nicht übertragen werden. Möglicherweise, wurden eine oder mehrere wichtige Positionen der TAS2R14 Bindungstasche noch nicht identifiziert. Des Weiteren könnte die Bindungstasche des TAS2R13 generell sehr klein sein und somit keinen Platz für TAS2R14-Agonisten bieten, so dass einzelne Punktmutationen keinen Effekt haben. Da die TAS2R13-Mutanten nicht mehr durch die TAS2R13-Agonisten aktiviert werden können, lässt sich eine generelle Fehlfaltung des Rezeptors nicht ausschließen, wodurch eine Aktivierung durch TAS2R14-Agonisten unmöglich wäre.

Die zu Beginn erstellten Homologie-Modelle können leider auch keinen klärenden Hinweis liefern, woraus sich schließen lässt, dass die *in silico* Modelle noch weiter an die natürliche Struktur der Rezeptoren angepasst werden muss.

## 3.2 Untersuchung gemeinsamer TAS2R14-Agonistenstrukturen

Die Agonisten des TAS2R14 stammen aus verschiedenen chemischen Klassen und sind sowohl in Größe (Molekulargewicht), Form (Zahl der aromatischen Ringe und Seitenketten), Polarität (z. B. Zahl der Wasserstoffakzeptoren und -donatoren) und in der Anzahl der rotierbaren Bindungen innerhalb des Moleküls sehr unterschiedlich. Die ersten Untersuchungen des TAS2R14 konnten kein gemeinsames chemisches Merkmal der TAS2R14-Agonisten aufdecken (Behrens et al., 2004).

Um die Agonisten näher zu untersuchen, wurden drei Herangehensweisen verfolgt:

- 1) Erstellung von Pharmakophormodellen auf der Basis von bekannten TAS2R14-Agonisten (in Kooperation mit Masha Niv und Anat Levit (The Hebrew University of Jerusalem, Israel), um neue TAS2R14-Agonisten vorherzusagen und zu überprüfen (Kapitel:3.2.1)
- 2) Charakterisierung der bekannten Agonisten durch Erstellung einer auf pharmakologischen Parametern basierenden Rangfolge (Kapitel: 3.2.2)
- 3) Gezielte Veränderung bekannter TAS2R14-Agonisten (in Kooperation mit Rafik Karaman und Kollegen (College of Pharmacy / Al-Quds University, Palestine) und Charakterisierung dieser Derivate (Kapitel: 3.2.3)

### 3.2.1 Pharmakologische Charakterisierung der TAS2R14-Agonisten

Zur Erstellung der Pharmakophormodelle wurden durch unseren Kooperationspartner Masha Y. Niv (The Hebrew University of Jerusalem, Israel) 5 TAS2R14-Agonisten mit stark voneinander abweichender Struktur ausgewählt: Flufenaminsäure, 8-Prenylnaringenin, Cis-Isohumulon, Artemorin und Parthenolid (Abbildung 34 A, Levit & Nowak & Peters, et al; 2014). Zur Erstellung von Pharmakophormodellen wurden drei verschiedene Methoden benutzt: das 3D ligandbasierende Pharmakophormodell (LBP-Modell), das 3D oberflächenbasierte Pharmakophormodell (OBP-Modell) und das 3D strukturbasierte Pharmakophormodell (SBP-Modell).

Das LBP-Modell wurde nach dem HipHop-Algorithmus mit dem Programm „Discovery Studio Modeling Environment“ erstellt. Der Algorithmus leitet gemeinsame Merkmale unter Verwendung von Informationen aus einer Reihe von Verbindungen gegenüber dem Ziel aktiv ab. Dabei entstanden 50 mögliche LBP-Modell, welche verschiedene Kombinationen chemischer Merkmale trugen. Diese Modelle wurden zunächst unter Nutzung der BitterDB-

Datenbank (<http://bitterdb.agri.huji.ac.il/>) und der DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>), mit dem Wissen über bekannte TAS2R14-Agonisten und anderen Bitterstoffen geprüft, um unpassende Modelle heraus zu filtern.

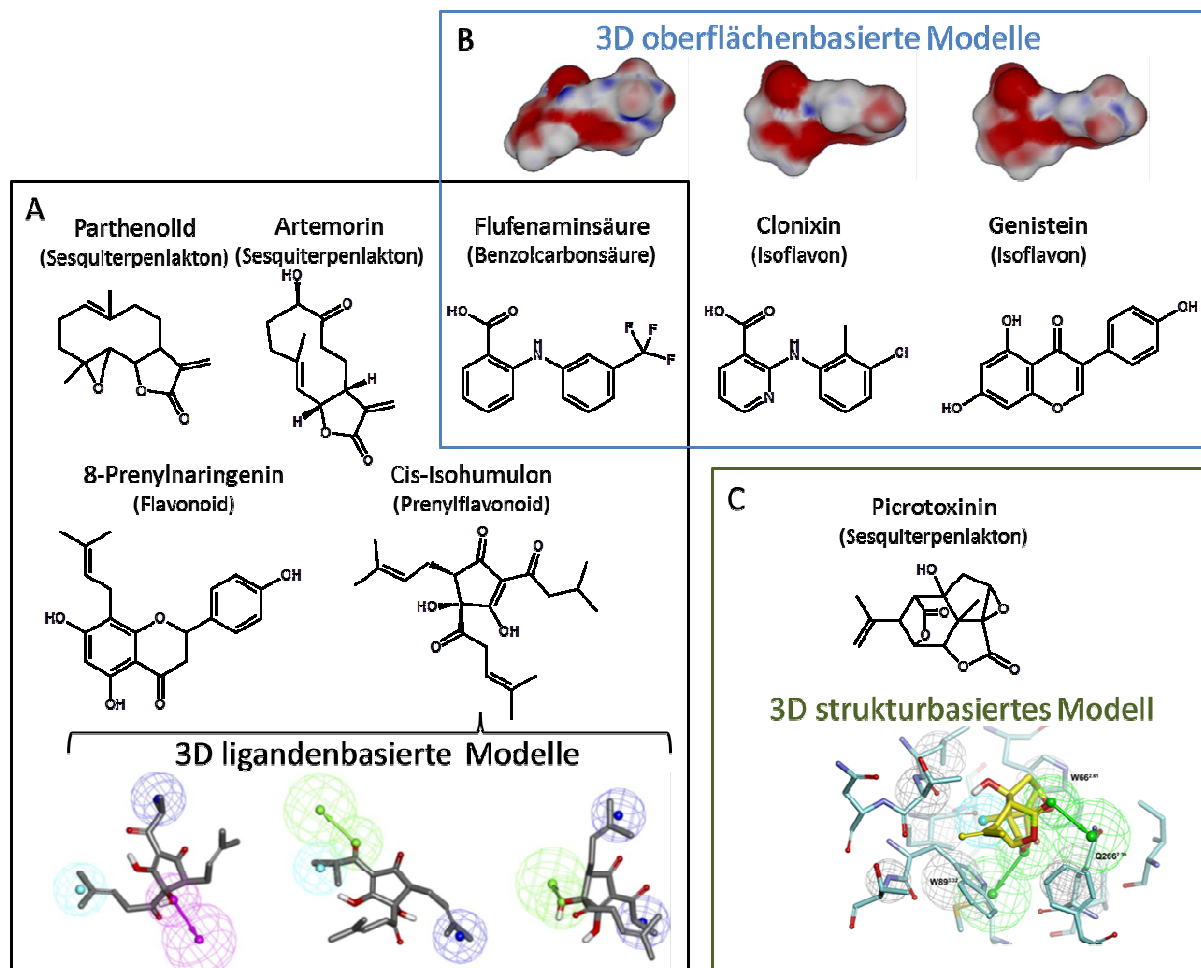


Abbildung 34: Verschiedene Pharmakophormodelle für ausgewählte TAS2R14-Agonisten

A) Agonisten für 3D ligandenbasierte Pharmakophormodelle (LBP-Modelle) und Modellbeispiele für Cis-Isohumulon: Das Pharmakophor wird als Kugeln mit Richtungsvektoren dargestellt (Akzeptoren von Wasserstoffbindungen in grün; Magenta repräsentiert Donatoren für Wasserstoffbindungen; hellblau und blau für hydrophobe Merkmale).

B) Agonisten mit deren 3D oberflächenbasierten Modellen (OBP-Modelle):

Pharmakophor ist als elektrostatisches Volumenmodell dargestellt (die Partialladungen sind von blau negativ über weiß zu Rot positiv dargestellt)

C) Picrotoxinin mit seinem 3D strukturbasiertem Pharmakophormodell (SBP-Modelle):

Der Ligand ist in Gelbe und die Aminosäurenreste des Rezeptors in Hellblauen abgebildet. Das Pharmakophor wird als Kugeln mit Richtungsvektoren dargestellt (Grüne Kugeln für Akzeptoren von Wasserstoffbindungen, hellblau für hydrophobe Interaktionsmöglichkeit und grau für funktionell ausgeschlossenen Bereiche).

(A und B: Levit & Nowak & Peters, et al; 2014; C: Levit, unpubliziertes Modell).

Zusätzlich wurden durch Maximilian Peters (The Hebrew University, Jerusalem, Israel) 3D oberflächenbasierte Modelle (OBP-Modell; shape-based model) mit dem Programm OMEGA 2.4.6 (OpenEye Scientific Software, Santa Fe, NM, USA) erstellt und die Formen

---

mit der Form des Ausgangsliganden mit dem Programm ROCS 3.1.2 (OpenEye Scientific) verglichen. Die Elektrostatik der Moleküle wurde mit dem Programm EON 2.1.0 (Open-Eye Scientific) betrachtet und weitere Vorhersagen mit Hilfe der oben genannten Datenbanken getroffen (Abbildung 34 B, Levit & Nowak & Peters, et al; 2014).

Nach den funktionellen Untersuchungen der Bindetasche mit Pikrotoxinin, als einer der ersten identifizierten Agonisten und gut messbarer Partialagonist, wurde Pikrotoxinin als Grundlage für ein weiteres 3D strukturbasiertes Pharmakophormodell (SBP-Modell) ausgewählt (Abbildung 34 C, unpubliziert durch Anat Levit erstellt). Dieses Modell bezieht sich direkt auf die Lage des Pikrotoxinins in der Bindungstasche und mit welchen Aminosäureresten es interagiert. Für die Vorhersage wird dann ausgehend von der interagierenden Bindetaschenposition nach möglichen weiteren Agonisten gesucht.

Beide Pharmakophormodelltypen, LBP-Modelle und OBP-Modelle, führten zur Vorhersage von unterschiedlichen potentiellen TAS2R14-Agonisten (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014), welche funktionell im heterologen HEK293T-Zellsystem von mir überprüft wurden. Mit dem LBP-Modell konnten 18 potenzielle Agonisten in der BitterDB gefunden werden. Fünf davon waren kommerziell erhältliche Substanzen, wovon 4 als tatsächliche Agonisten des TAS2R14 bestätigt werden konnten (Ethylhydrocuprein, Secobarbital, Tributyrin, Triethylcitrat; Abbildung 35 A).

Mit den OBP-Modellen konnten 7 Substanzen in der BitterDB als mögliche Agonisten identifiziert werden und davon wurden 5 experimentell als TAS2R14-Agonisten nachgewiesen (Clonixin, 3,5-Diiodsalicylsäure, Naringenin, o-(p-Anisoyl)-Benzoessäure, Quercetin; Abbildung 35 B).

In der Drug-Bank konnten mit dem LBP-Modell 16 Substanzen herausgefiltert werden und davon 4 kommerziell erhältliche Substanzen als TAS2R14-Agonist bestätigt werden (Glimepirid, Miconazol, Malathion, Pantoprazol; Abbildung 36 A).

Mit dem OBP-Modell konnten in der Drug-Bank 9 Substanz als potentielle Agonisten des TAS2R14 vorhergesagt werden und 7 davon wurden funktionell als TAS2R14-Agonisten nachgewiesen (Mefenaminsäure, Nifluminsäure, Diclofenac, Hesperetin, Kaempferol, Pemirolast, Salsalat; Abbildung 36 B und C).



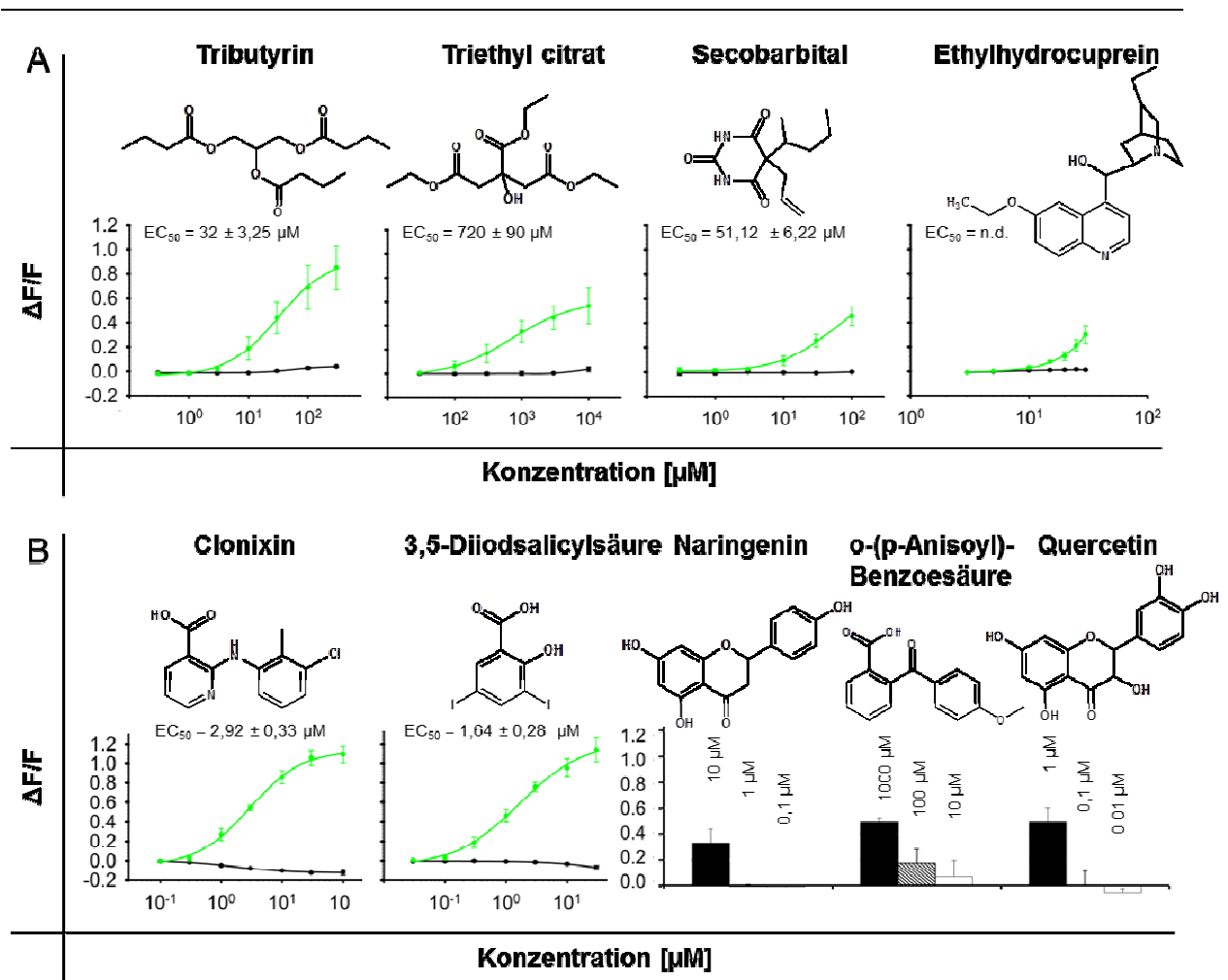


Abbildung 35: Vorhergesagte und bestätigte TAS2R14-Agonisten aus der BitterDB

Die Vorhersagen wurden mit Hilfe des auf 3D Ligandenbindung beruhenden Pharmakophormodells (A) und mit einem auf 3D-Oberflächen-basierten Modell (B) getroffen; die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen den Wildtyp-TAS2R14 (grün) und den Leervektor (schwarz); die Balkendiagramme zeigen je 3 gemessenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz.

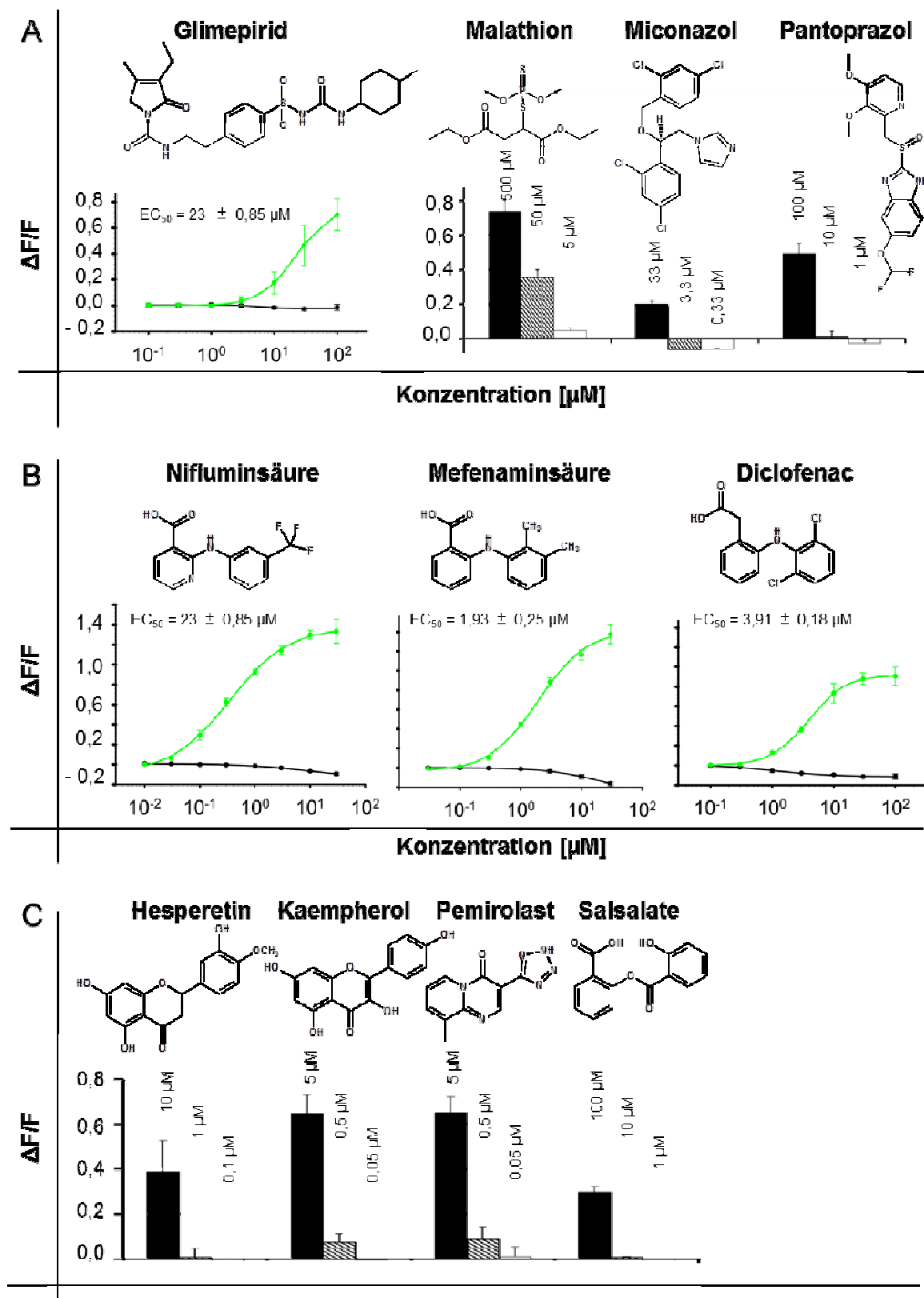


Abbildung 36: Vorhergesagte TAS2R14-Agonisten aus der Drugbank

Die Vorhersagen wurden mit Hilfe des auf 3D Ligandenbindung beruhenden Pharmakophormodells (A) und mit einem 3D-Oberflächen-basierten Modell (B und C) getroffen; die Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen den Wildtyp-TAS2R14 (grün) und den Leervektor (schwarz); die Balkendiagramme zeigen je 3 gemessenen Konzentrationen der jeweiligen Substanz.

Bei der Erstellung eines 3D strukturbasierten Pharmakophormodells (SBP-Modell) ausgehend von Pikrotoxinin (Abbildung 34 C, unpubliziert durch Anat Levit erstellt) entstanden zunächst 5 Modelle. Nach der Vorhersage von Agonisten und Nicht-Agonisten sowie deren Bestätigung durch funktionelle Untersuchungen der Substanzen am Bitterrezeptor TAS2R14, konnte daraus ein passendes Modell identifiziert werden. Unter den vorhergesagten Agonisten dieses Modells befand sich ebenfalls Triethylcitrat, welches bereits mit dem LBP-Modell identifiziert und funktionell bestätigt wurde. Als neue Agonisten konnten Guaifenesin und Dehydrocholsäure bestätigt werden (unpubliziert Levit & Nowak, Abbildung 37).

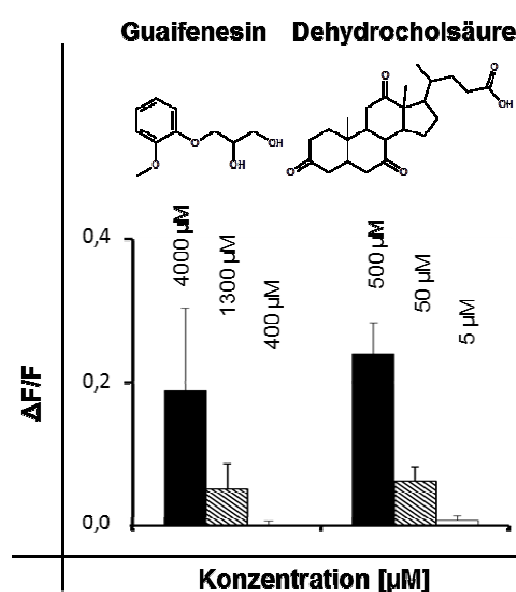


Abbildung 37: Vorhergesagte und bestätigte TAS2R14-Agonisten aus der BitterDB

Die Vorhersage erfolgt auf der Grundlage von Pikrotoxinin mit dem 3D strukturbasierten Pharmakophormodell. Das Balkendiagramm zeigt je 3 gemessene Konzentrationen der jeweiligen Substanz und bestätigt sie als Agonisten des TAS2R14.

Die Untersuchungen der TAS2R14-Agonisten ergaben für die Mehrheit der TAS2R14-Aktivatoren folgende Merkmalsparameter: Molekulargewicht von 100 bis 600 g/mol, Zahl der aromatischen Ringe 0 bis 3, Zahl der Wasserstoffakzeptoren 2 bis 7, Zahl der Wasserstoffdonatoren 0 bis 3, Zahl der rotierbaren Bindungen 0 bis 10, Formalladungen 0 bis 1 (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014).

Die Reduktion auf ein einzelnes Pharmakophormodell war nicht möglich, da die TAS2R14-Agonisten sehr unterschiedliche Grundgerüste besitzen und demzufolge Agonisten ausgehend von verschiedenartigen Basisstrukturen existieren.

### 3.2.2 Potenz und Effizienz einzelner TAS2R14-Agonisten

Bei Messungen von TAS2R14-Agonisten war auffällig, dass sich sowohl die Potenz als auch Effizienz mit der die Substanzen den Rezeptor TAS2R14 aktivieren stark unterscheiden. Da

die TAS2R14-Agonisten sich teilweise stark in ihrer Struktur unterscheiden, aber einige auch gleiche Merkmale aufweisen, sollten diese strukturellen Unterschiede mit der funktionellen Bedeutung für die Aktivierung in Beziehung gebracht werden. Dazu wurden die verschiedenen TAS2R14-Agonisten auf ihr Aktivierungspotenzial untersucht und daraufhin eine standardisierte Rangliste erstellt.

Zur Erstellung der Rangliste wurden TAS2R14-Agonisten gewählt, die über einen Konzentrationsbereich von ca. zwei Zehnerpotenzen eine klare Konzentrationsabhängigkeit zeigen. Des Weiteren wurden die Konzentrationen des Agonisten so gewählt, dass keine unspezifischen Aktivierungen (Artefakt) in den Leervektor-transfizierten Zellen auftraten. Alle TAS2R14-Agonisten wurden zeitnah und parallel mit der Referenzsubstanz Flufenaminsäure gemessen. Der Vollagonist Flufenaminsäure aktiviert den Rezeptor TAS2R14 mit der größten Potenz verglichen mit anderen TAS2R14-Agonisten und wurde daher als Referenzsubstanz ausgewählt. Die Signalhöhe von Flufenaminsäure bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M wurde bei jeder Messung als 100 % angenommen.

Zusätzlich wurden alle Messdaten der Untersuchung des TAS2R14-Wildtyprezeptors der Substanzen (Aristolochiasäure, Flufenaminsäure, Pikrotoxinin, Santonin, Parthenolid, Thujon und Genestein), welche bei der Charakterisierung der Bindungstasche generiert wurden, in die Auswertung mit einbezogen (Kapitel: 3.1.1, 3.1.2 und 3.1.3).

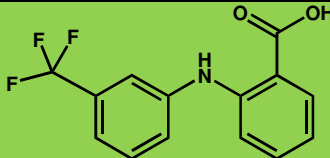
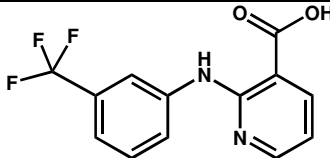
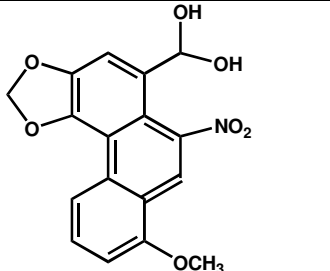
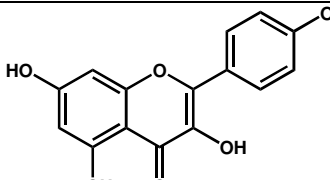
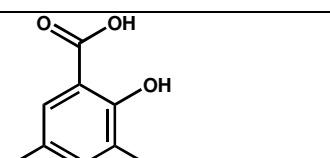
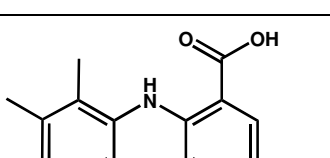
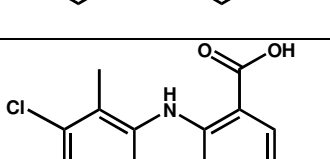
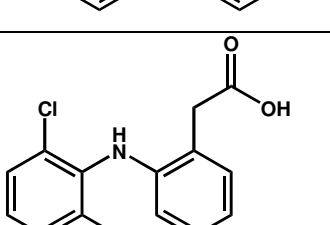
Die Agonisten wurden in Tabelle 7 erstens nach ihrem Schwellenwert (TH= threshold) sortiert und zweitens nach dem EC<sub>50</sub>-Wert. Da die meisten Dosis-Wirkungs-Kurven keine Sättigung zeigen, ist der EC<sub>50</sub>-Werte in vielen Fällen extrapoliert.

Die getesteten 25 TAS2R14-Agonisten zeigen einen Schwellenwert zwischen 0,01  $\mu$ M bei Flufenaminsäure bis 1000  $\mu$ M bei Coumarin. Bei den Maximalamplituden erreicht Mefenaminsäure mit 132,25 % bezogen auf Flufenaminsäure die beste Aktivierung des Rezeptors und Chininsulfat mit 11,33 % die schlechteste TAS2R14-Aktivierung.

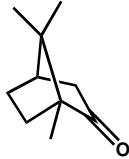
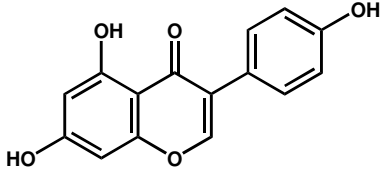
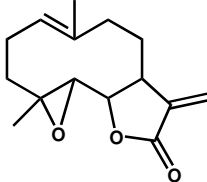
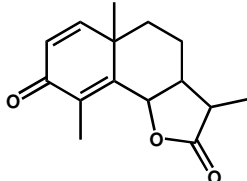
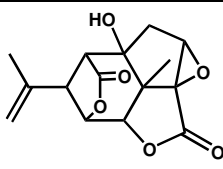
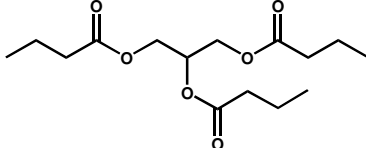
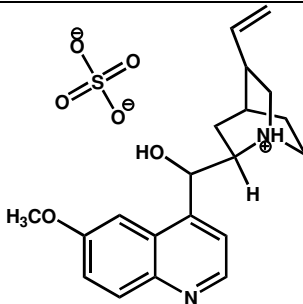
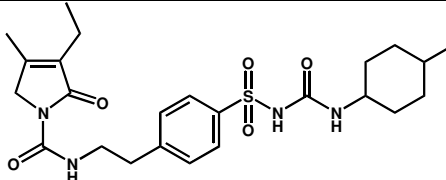
Substanzen, welche den Rezeptor schon mit geringerer Konzentration aktivieren, zeigen auch häufig eine sehr hohe Maximalamplitude. Jedoch gibt es auch Ausnahmen wie beispielsweise Kaempferol an der vierten Position in der Rangliste mit einem Schwellenwert von 0,3  $\mu$ M mit nur 48,63% Maximalamplitude. Mit einem zehnfach höheren Schwellenwert steht Tributyrin an 14. Position und hat eine Maximalamplitude von 81,47 %.

Tabelle 7: Rangliste der Aktivierungspotenzen und -effizienzen für die TAS2R14-Agonisten

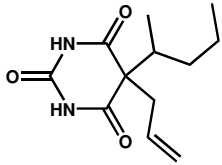
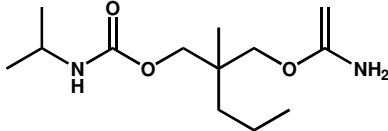
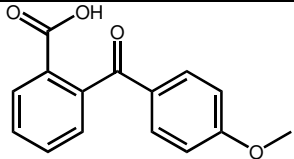
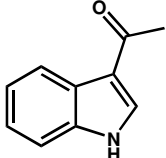
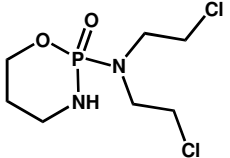
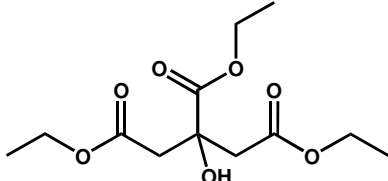
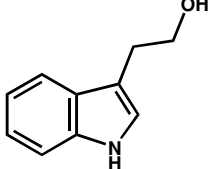
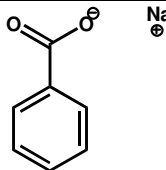
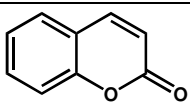
Schwellenwerte (TH), die EC<sub>50</sub>-Werte und die Aktivierung bei der höchsten gemessenen Konzentration (max.A) bezogen auf die maximale Amplitude von Flufenaminsäure der jeweiligen Referenzmessung; \*Messungen erfolgten unter meiner Anleitung durch Julia Merschenz während ihrer Bachelorarbeit

Substanzen	Struktur	TH [ $\mu\text{M}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	max. A. [%]
Flufenaminsäure		0,01	0,08 ± 0,01	100,00
Nifluminsäure		0,03	0,35 ± 0,03	128,25
Aristolochiasäure		0,1	0,49 ± 0,03	115,49
Kaempferol		0,3	1,40 ± 0,01	48,63
3,5-Diiodosalicylsäure		0,3	1,63 ± 0,28	109,62
Mefenaminsäure		0,3	1,94 ± 0,25	132,25
Clonixin		0,3	2,89 ± 0,33	104,91
Diclofenac		0,3	3,91 ± 0,18	87,23

Weiterführung der Tabelle 7

Substanzen	Struktur	TH [ $\mu\text{M}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	max. A. [%]
Camphor *		1	n.d.	43,71
Genistein		1	5,00 ± 0,37	49,76
Parthenolid		1	10,30 ± 0,32	53,56
(-)- $\alpha$ -Santonin		3	9,03 ± 0,62	54,99
Pikrotoxinin		3	13,16 ± 0,93	54,51
Tributyryl		3	32 ± 3,25	81,47
Chininsulfat *		6	n.d.	11,33
Glimepirid		10	23,25 ± 0,86	67,68

Weiterführung der Tabelle 7

Substanzen	Struktur	TH [ $\mu\text{M}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	max. A. [%]
Secobarbital		10	51,12 ± 6,22	43,90
Carisoprodol *		30	71,94 ± 3,2	28,27
o-(p-Anisoyl)-Benzoessäure		30	126,64 ± 5,41	78,34
3-Acetylintol *		100	137,85 ± 15,00	45,73
Cyclophosphamid		100	324,87 ± 30,02	34,92
Triethylcitrat		100	720 ± 90	54,27
3-(2-Hydroxyethyl)-indol *		300	459,35 ± 20,30	26,16
Natriumbenzoat *		1000	2210 ± 260	25,41
Coumarin *		1000	n.d.	32,30

### 3.2.3 Gezielte Modifikation von TAS2R14-Agonisten

Eine weitere Analyse der Agonisten erfolgt durch die gezielte Modifikation von einzelnen Agonisten mit dem Ziel, den Zusammenhang zwischen der Struktur des modifizierten Agonisten und der Aktivierungseigenschaft des Rezeptors TAS2R14 zu analysieren. Gleichzeitig bestand die Möglichkeit, Antagonisten zu finden, die für die weitere Charakterisierung des TAS2R14 wichtig sind, sowie metabolisch aktivierbare Prodrugen, die nicht bitter schmecken, zu identifizieren.

Die untersuchten Substanzen bzw. Derivate wurden entweder käuflich erworben oder durch Rafik Karaman und Kollegen (College of Pharmacy / Al-Quds University, Palestine) synthetisiert. Die Synthese erfolgte ausgehend von 5 TAS2R14-Agonisten: Coumarin und Guaifenesin (unpublizierte Daten), Mefenaminsäure, Diclofenac und Benzoin (Karaman et al., 2016).

Die neu synthetisierten Substanzen wurden funktionell auf die Aktivierung des TAS2R14 getestet (Abbildungen 38 - 42). Dabei wurden immer drei Konzentrationen an mindestens zwei verschiedenen Messtagen getestet. Die höchste Konzentration ergab sich aus der Löslichkeit der jeweiligen Substanz und auf der maximalen Konzentration, die signalfrei auf den leervektor transfizierten Zellen gemessen werden konnte.

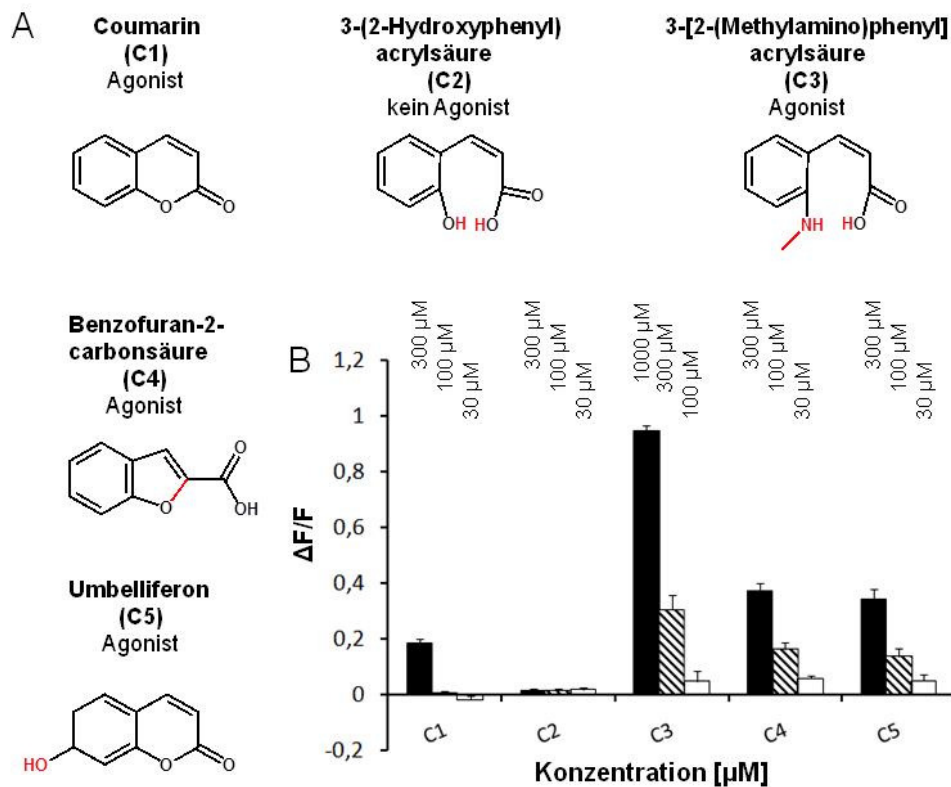


Abbildung 38: Modifikation von Coumarin

Die Abbildung zeigt A) Substanzname und die dazugehörige Struktur und B) die Ergebnisse der funktionellen Analyse des TAS2R14 mit 3 Konzentration [µM] der jeweiligen Substanz.



Coumarin (1,2-Benzopyron; C1) und seine Derivate (C2-C5) sind in Abbildung 38 dargestellt. Coumarin ist ein natürlicher Geruchsstoff in Pflanzen. Es stellt einen eher kleinen TAS2R14-Agonisten dar und hat somit vermutlich wenig Interaktionspunkte zum Rezeptor. Die erste Modifikation am Coumarin, war die Öffnung des Pyron-Rings, die entstandene Substanz 3-(2-Hydroxyphenyl)acrylsäure (C2) konnte den Rezeptor TAS2R14 nicht aktivieren. Des Weiteren wurden die Hydroxylgruppe durch ein Methylaminogruppe ersetzt (3-[2-Methylamino)phenyl]acrylsäure (C3)), wodurch die Aktivierung des TAS2R14 möglich war. Bei der nächsten Modifikation wurde stattdessen ein Ringschluss eingeführt (Benzofuran-2-carbonsäure (C4)), so dass ein Furan-Ring entstand. Umbelliferon (7-hydroxycoumarin; C5) unterscheidet sich vom Coumarin nur durch eine zusätzliche Hydroxylgruppe. Die Ausgangssubstanz, Coumarin (C1) aktiviert den Rezeptor TAS2R14 am schlechtesten. Die Benzofuran-2-carbonsäure (C4) und Umbelliferon (C5) aktivieren den TAS2R14 mit  $\sim 0,4 \Delta F/F$  doppelt so hoch wie die Ausgangssubstanz Coumarin (C1) bei der Konzentration  $300 \mu\text{M}$  und haben einen signifikant niedrigeren Schwellenwert (geringste, gemessene Konzentration mit signifikantem Signal) mit  $30 \mu\text{M}$  verglichen mit Coumarin mit  $300 \mu\text{M}$ .

C4 und C5 weisen wie Coumarin einen aromatischen Kohlenwasserstoffring und einen sauerstoffhaltigen, heterozyklischen Ring auf und zusätzliche funktionelle Gruppen, welche in der Bindungstasche des TAS2R14 basierend auf funktionellen Untersuchungen offenbar mehr Interaktionspotenzial bieten. C3 hat wie C4 eine Carboxylgruppe mit dem Potenzial einer Anionen- $\pi$ -Wechselwirkung, welche sich positiv auf die Aktivierung auswirkt. Jedoch hat C3 keinen heterozyklischen Ring, was scheinbar die Begründung für den höheren Schwellenwert verglichen mit der Aktivierung durch C4 darstellt. Ohne die zusätzliche Methylaminogruppe mit der Möglichkeit der Kationen- $\pi$ -Wechselwirkung, gäbe es jedoch keine Aktivierung, wie bei C2.

Minimale Veränderungen am Ausgangsagonist Coumarin haben eine hohe Bedeutung für die Funktion. Sie können entscheidend sein, ob eine Substanz nicht (siehe C2) oder den TAS2R14 viel besser als der Ausgangsagonist aktiviert.

Auch bei Guaifenesin (3-(2-methoxyphenoxy)propan-1,2-diol), welches zur Lösung von Bronchialsekret bei Atemwegserkrankungen verwendet wird, hat als kleineres Ausgangsmolekül den höchsten Schwellenwert verglichen mit dessen Derivaten (Abbildung 39).

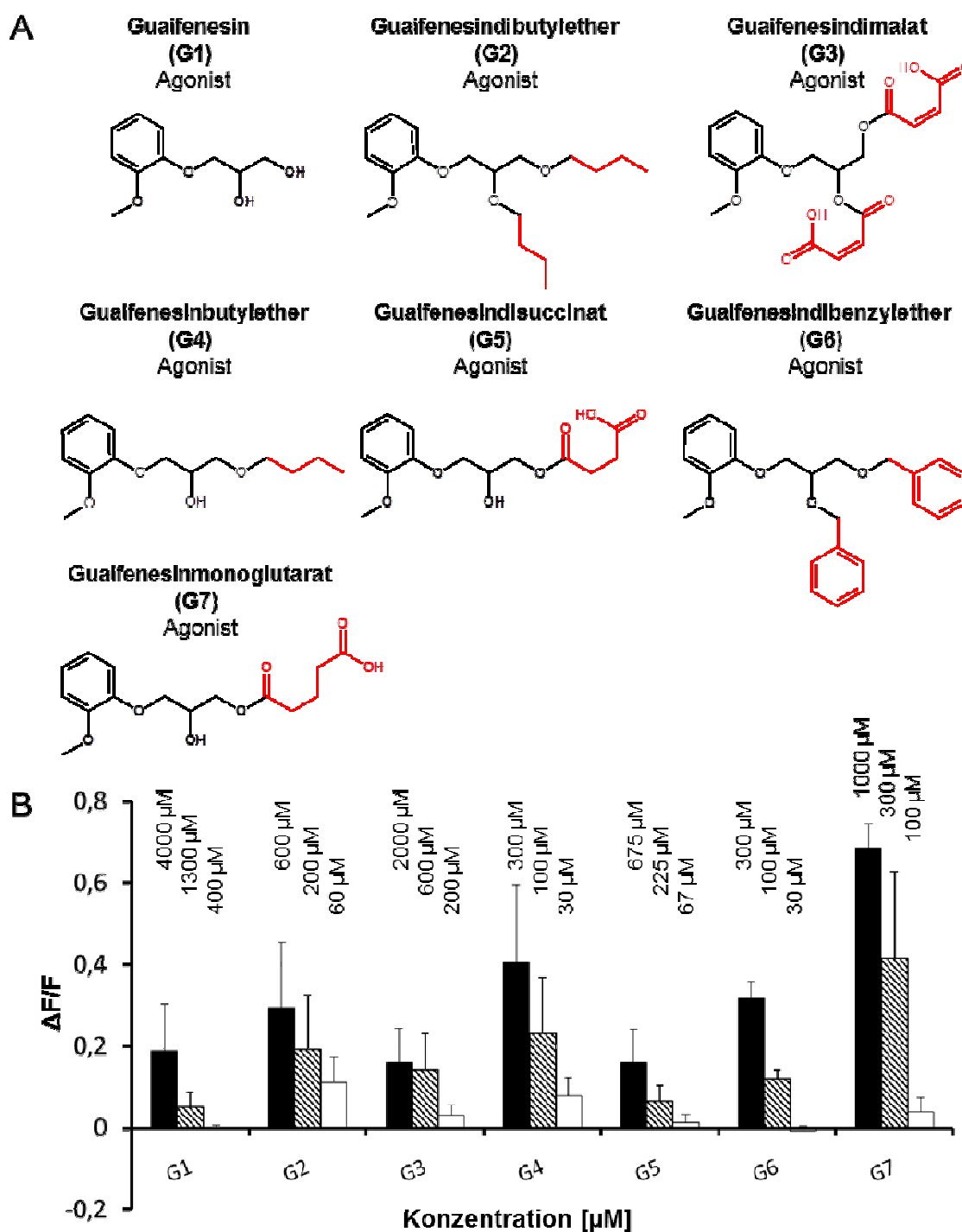


Abbildung 39: Modifikation von Guaifenesin

Die Abbildung zeigt A) Substanzname und die dazugehörige Struktur und B) die Ergebnisse der funktionellen Analyse des TAS2R14 mit 3 Konzentration [μM] der jeweiligen Substanz.

Die höchsten Amplituden konnten bei der Substanz Guaifenesinmonoglutarat (G7) mit ~ 0,7  $\Delta F/F$  bei 1000  $\mu M$  gemessen werden. Guaifenesinbutylether (G4) konnte den TAS2R14 mit der geringsten Konzentration von 30  $\mu M$  mit ~ 0,1  $\Delta F/F$  aktivieren (kleinster Schwellenwert) - verglichen mit den anderen Derivaten und der Ausgangssubstanz. Beide Substanzen tragen eine Erweiterung der aliphatischen Kette. Bei G4 handelt es sich um einen

Butylrest und bei G7 mit einer gleich großen aliphatischen Kette, welche durch Esterbindung angehängen wurde, sowie einer zusätzlichen Carboxylgruppe. Beide Derivate aktivieren den TAS2R14 mit  $\sim 0,4 \Delta F/F$  bei der Konzentration  $300 \mu\text{M}$ , bei der der Rezeptor durch die Ausgangssubstanz G1 nicht aktiviert werden kann.

Bei der Erweiterung von Guaifenesin um zwei zusätzliche Seitenketten, zeigte die Substanz Guaifenesindibenzylether (G6) mit je einem Benzylring bei einer Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  eine Aktivierung des TAS2R14 von  $\sim 0,3 \Delta F/F$ . Bei Guaifenesindibutylether (G2) mit zwei Butylringen konnte die gleiche Amplitude erst bei doppelter Konzentration erreicht werden. Guaifenesindimalat (G3) und Guaifenesindisuccinat (G5) mit je zwei aliphatischen Ketten mit je einer zusätzlichen Carboxylgruppe und Esterbindung, zeigen mit ihren polaren Seitenketten eine verschlechterte Aktivierung verglichen zu G6 und G2 mit ihren hydrophoben Anhängen. Nach den Schwellenwerten zeichnet sich bei den Guaifenesin-Derivaten folgende Muster ab: Um die Aktivierung des TAS2R14 bei möglichst geringer Potenz zu erreichen, ist es besser beim Guaifenesin nur eine zusätzliche Seitenkette anzuhängen und dann eher einen hydrophoben Rest als ein polares ( $G1 > G7 > G5 > G6 > G2 > G4$ ). Betrachtet man die Aktivierungsstärke, so erreicht G7 (Erweiterung des Guaifenesins um eine polare aliphatische Seitenkette) die stärkste maximale Aktivierung und kommt einem Vollagonisten sehr nah.

Bei der Mefenaminsäure (2-(2,3-dimethylphenyl)aminobenzoessäure; M1; Abbildung 40) und dem Diclofenac (2-[2-(2,6-dichloroanilino)phenyl]acetylsäure; D1, Abbildung 41) hingegen konnten die Ausgangssubstanzen den TAS2R14 besser aktivieren. Beide Substanzen haben eine flufenaminsäureähnliche Struktur und werden häufig als schmerzhemmende und entzündliche Wirkstoffe eingenommen (Beck et al., 2003; Karaman et al., 2016; Moll et al., 2011).

Mefenaminsäure zählt zu den Vollagonisten und aktiviert den TAS2R14 mit sehr großer Potenz. Die erste Modifikation an der Mefenaminsäure war die Verknüpfung eines zusätzlichen Phenylringes mit der Carboxylgruppe (Mefenaminbenzylester (M3)), dabei konnte eine geringere Amplitude von  $\sim 0,8 \Delta F/F$  bei der Konzentration  $10 \mu\text{M}$  erreicht werden. Bei einer Konzentration  $30 \mu\text{M}$  und höher zeigt diese Substanz ein rezeptorunabhängiges und damit unspezifisches Signal. Somit können keine Aussagen zur Rezeptoraktivierung bei dieser hohen Konzentration gemacht werden.

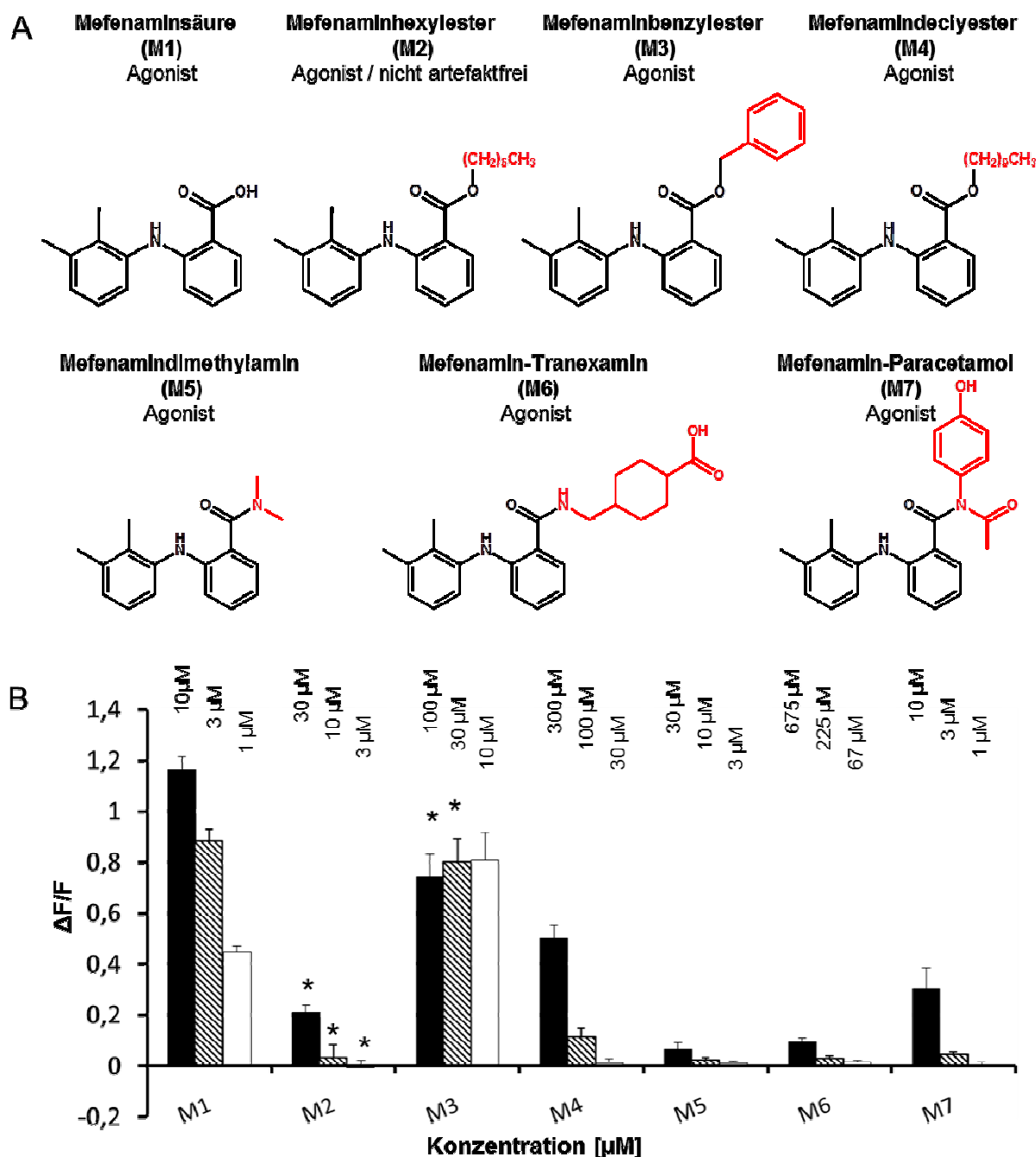


Abbildung 40: Modifikation von Mefenaminsäure

Die Abbildung zeigt A) Substanzname und die dazugehörige Struktur und B) die Ergebnisse der funktionellen Analyse des TAS2R14 mit 3 Konzentration [μM] der jeweiligen Substanz. \* Signal nach Abzug des unspezifischen Signals in den nicht-transfizierten Zellen, reale Signalthöhe und TAS2R14-unabhängiges Signal können mathematisch nicht zuverlässig getrennt werden, somit ist die tatsächliche rezeptorspezifische Signalthöhe nicht genau bestimmbar.

Mefenaminoxylester (M2) und Mefenaminoxylester (M4) tragen zwei zusätzliche unterschiedlich lange, aliphatische Seitenketten an der Carboxylgruppe. Da M2 bei allen gemessenen Konzentrationen ein unspezifisches Signal in den nicht-transfizierten Zellen zeigte, konnte es zwar als Agonist identifiziert werden, aber direkte Rückschlüsse auf die Höhe der Aktivierung sind nicht möglich. M4 konnte den TAS2R14 schlechter aktivieren als

M3 und zeigte erst bei 100  $\mu\text{M}$  eine signifikante Aktivierung. Ein Dimethylamin an dieser Position wie bei M5 führt zu einem sehr kleinen Signal bei der Konzentration 30  $\mu\text{M}$ .

Oft werden Wirkstoffe auch in Kombination mit Mefenaminsäure gegeben, daher wurden der gerinnungsfördernd Wirkstoff Tranexamin (M6) und der ebenfalls schmerzlindernde Wirkstoff Paracetamol (M7) mit Mefenaminsäure verknüpft und auf die Aktivierung des TAS2R14s geprüft. Beide Substanzen M6 und M7 zeigen eine geringere Aktivierung und somit lässt sich eine Reduktion des Bittergeschmacks vermuten. Die tatsächliche Reduktion des Bittergeschmacks müsste allerdings auch bei den anderen Bitterrezeptoren im funktionellen Experiment untersucht werden und final in sensorischen Tests überprüft werden.

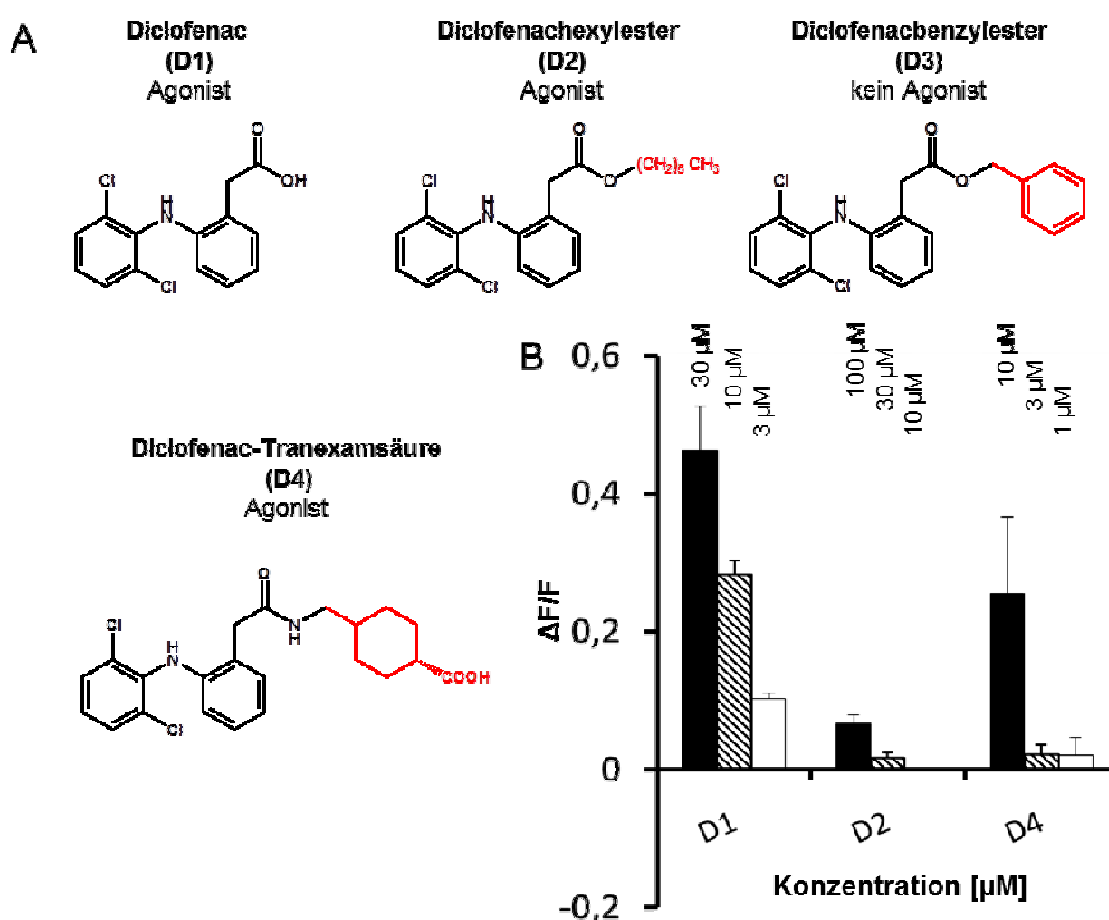


Abbildung 41: Modifikation von Diclofenac

Die Abbildung zeigt A) Substanzname und die dazugehörige Struktur und B) die Ergebnisse der funktionellen Analyse des TAS2R14 mit 3 Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] der jeweiligen Substanz.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob die Übertragung von gleichen Modifikationen bei ähnlichen Agonisten des TAS2R14 sich in gleicher Art und Weise auswirken. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde Diclofenac, wie Mefenaminsäure, ebenfalls mit einem Hexyl- (D2) und einem Benzylrest (D3) verestert (Abbildung 41). Bei den Diclofenac-

Derivaten zeigt sich eine starke Reduktion für Diclofenachexylester (D2) und bei der Modifikation mit einem zusätzlichen Benzylrest an der Carboxylgruppe (Diclofenacbenzylester, D3) konnte der TAS2R14 nicht mehr aktiviert werden (Abbildung 41). Die Verknüpfung von Diclofenac und Tranexamsäure aktiviert den Rezeptor TAS2R14 bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M wie die Ausgangssubstanz Diclofenac.

Daraus ergibt sich, dass die gleichen Modifikationen an einem weniger potenten Agonisten zu einer deutlicheren stärkeren Änderung der Aktivierung des TAS2R14 führen können.

Da die Funktionsanalyse der heterolog exprimierten Bitterrezeptoren keine Rückschlüsse auf die Bindeaktivität von Substanzen in der Bindungstasche zulässt, sondern nur die Rezeptoraktivierung zeigt, wurde die Substanz D3 in einem weiteren Experiment untersucht. Dazu wurde die Substanz D3 mit dem Agonisten Aristolochiasäure gemischt und sowohl das Substanzgemisch als auch Aristolochiasäure allein auf die Aktivierung des TAS2R14 getestet. Da beide Testlösungen eine gleichstarke Aktivierung des Rezeptors zeigten, lässt sich daraus schließen, dass das Diclofenac-Derivat D3 nicht in die Bindungstasche passt und somit nicht als Konkurrenz zur Aristolochiasäure auftritt.

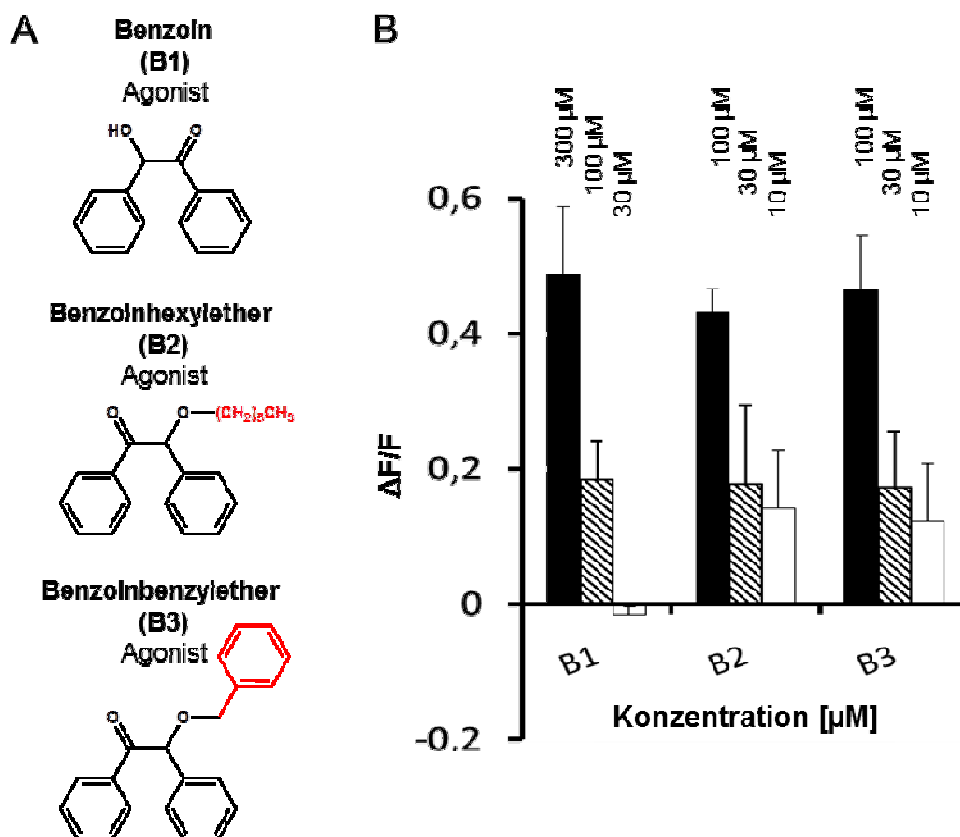


Abbildung 42: Modifikation von Benzoin

Die Abbildung zeigt A) Substanzname und die dazugehörige Struktur und B) die Ergebnisse der funktionellen Analyse des TAS2R14 mit 3 Konzentration [ $\mu$ M] der jeweiligen Substanz.

Zur Bestätigung der Beobachtungen wurde Benzoin modifiziert (Abbildung 42). Benzoin kann aus Pflanzen gewonnen werden und stellt ein sehr einfaches, aromatisches Hydroxyketon dar. Wie Diclofenac ist Benzoin ein partieller Agonist jedoch mit einer geringeren Potenz. Überraschenderweise, kann das modifizierte Benzoin mit der aliphatischen Kohlenstoffwasserstoffkette (B2) bzw. mit dem aromatischen Benzylrest (B3) den TAS2R14 schon bei einer 10fach geringeren Konzentration aktivieren.

Dieselben Modifikationen mit einer zusätzlichen Hexylgruppe oder mit einem Phenylring, führten bei den potenten Agonisten, Mefenaminsäure (Abbildung 40) und Diclofenac (Abbildung 41), zu stärkeren Beeinträchtigungen bis zum Verlust der TAS2R14-Aktivierung. So verschieden wie die Aktivierungspotentiale der einzelnen Agonisten sind, wirken sich auch gleichartige Modifikationen an verschiedene Agonisten sehr unterschiedlich aus.

Diese Daten weisen auf unterschiedliche Bindungsmodi hin, welche durch *in silico* Analyse der Arbeitsgruppe von Masha Niv untermauert wurden (Karaman et al., 2016). Dabei zeigen sich  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen zwischen Mefenaminsäure und den Aminosäureresten an den Positionen **H94**<sup>3,37</sup>, **F186**<sup>5,46</sup> und **F243**<sup>6,51</sup> sowie eine Wasserstoffbrückenbindung mit **N93**<sup>3,36</sup> und **Q266**<sup>7,39</sup> (Abbildung 43A).

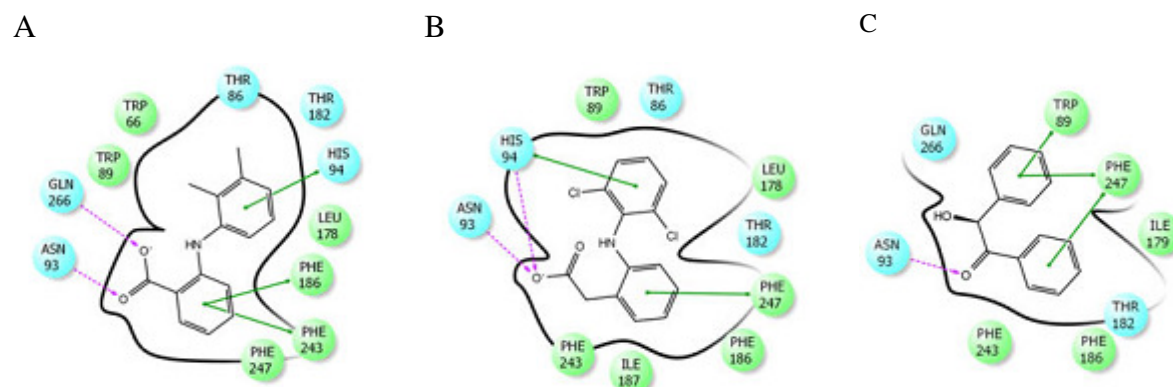


Abbildung 43: 2D-Darstellung der Interaktion von Mefenaminsäure, Diclofenac und Benzoin mit den Aminosäureresten des TAS2R14

Dargestellt sind die Agonisten (A) Mefenaminsäure, (B) Diclofenac und (C) Benzoin in der Bindungstasche des TAS2R14. Die polaren Aminosäuren sind in cyan und die hydrophoben Aminosäure in grün gekennzeichnet. (Karaman et al., 2016, Abbildung 5A-C)

Bei Diclofenac interagiert die Carboxylgruppe mit der Position **N93**<sup>3,36</sup> (Abbildung 43B). Die Position **H94**<sup>3,37</sup> hat sowohl hydrophobe als auch polare Interaktionen zum Ligand. Jedoch gibt es keine Interaktion zur den Positionen **F186**<sup>5,46</sup> und **Q266**<sup>7,39</sup>.

---

Benzoin interagiert mit **N93**<sup>3.36</sup> über eine Wasserstoffbrückenbindung und über aromatische Interaktionen mit **W89**<sup>3.32</sup> und **F247**<sup>6.55</sup>(Abbildung 43C).

### **Modifikation von Medikamenten zur Herstellung von nicht bzw. weniger bitteren Prodrogen**

Bei den ausgewählten Substanzen führen die Modifikationen oft zu einer Verbesserung der Aktivierung des TAS2R14. Als potentielle Prodroge kommt daher nur das Diclofenac-Derivat D2 in Frage, welches selbst den TAS2R14 nicht aktivieren kann. Des Weiteren zeigen die Mefenamin-Derivate M5 und M6, welche aus zwei Wirkstoffen mit ähnlicher Wirkung zusammengesetzt sind, experimentell eine geringe Aktivierung des Rezeptors TAS2R14. Um jedoch endgültige Schlüsse zu ziehen, müsste man die Aktivierbarkeit aller TAS2R testen, die Eigenschaften zur pH-abhängige Hydrolyse messen und letztlich sensorische Tests zur endgültigen, geschmacklichen Bestimmung. Da das Auffinden von Prodrogen nicht Gegenstand meiner Untersuchungen war, habe ich dieses nicht weiter untersucht.



## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Bitterrezeptor TAS2R14 auf seine Struktur- und Funktionsbeziehung hin unter Verwendung zweier Herangehensweisen untersucht: Einerseits wurde die Bindungstasche charakterisiert, indem potentielle Interaktionspositionen in der Bindungstasche basierend auf einem Homologiemodell des TAS2R14 identifiziert und durch funktionelle Analysen untersucht wurden. Hierdurch konnten acht interagierende Positionen verifiziert werden (Kapitel: 4.1 - 4.3).

Andererseits wurde das Ligandenspektrum des TAS2R14 mit Hilfe von Pharmakophormodellen sowie durch die Erstellung einer Rangliste der Aktivierungspotenz von 25 gut etablierten Agonisten und Derivaten von fünf Agonisten untersucht, um die gemeinsamen Agonistenmerkmale aufzudecken (Kapitel: 4.4.1).

Diese zwei ausgewählten Herangehensweisen haben mir ermöglicht, die zu Beginn dieser Arbeit gestellten Fragen zu beantworten: 1) Was sind die Besonderheiten der Bindungstasche des Bitterrezeptors TAS2R14 und wie gut ist sie zugänglich?, 2) Wie ist es möglich, dass so viele chemisch unterschiedliche Agonisten diesen Rezeptor aktivieren? und 3) Gibt es Gemeinsamkeiten und Unterschiede zu anderen TAS2Rs mit breitem Agonistenspektrum?

Eine weitere Frage ergab sich im Laufe der Arbeit, nachdem immer mehr Agonisten mit pharmakologischen Wirkungen identifiziert wurden: Hat das Ligandenspektrum des TAS2R14 eine besondere Vorhersagekraft für pharmakologische Effekte und kann somit die Aktivierbarkeit durch eine Substanz als Indikator für die Identifikation von neuen Medikamenten genutzt werden?

Im nächsten Kapitel möchte ich mit der Beantwortung der Frage zur Lokalisation der Bindungstasche beginnen.

### 4.1 Lokalisation der Bindungstasche

Zur Bestimmung der Lokalisation wurde ein Homologiemodell des TAS2R14 erstellt, um Aminosäurereste der potenziellen Bindungstasche des TAS2R14 vorherzusagen. Anschließend wurden diese durch funktionelle Analysen auf ihre Bedeutung für die Interaktion mit den Agonisten hin untersucht.

Diese Untersuchungen zeigten das Vorhandensein einer orthosterischen Bindungstasche, welche sich zwischen den Transmembrandomänen (TM) III, V, VI und VII befindet. Die

Existenz nur einer Bindungstasche sowie die Lage der Bindungstasche wurde bereits bei den Bitterrezeptoren TAS2R1 (Dai et al., 2011; Singh et al., 2011; Upadhyaya et al., 2010), TAS2R38 (Biarnes et al., 2010; Marchiori et al., 2013), TAS2R46 (Brockhoff et al., 2010) und TAS2R10 (Born et al., 2013) sowie bei weiteren GPCRs gezeigt werden (Nygaard et al., 2009). Beim Rezeptor TAS2R16 konnte ebenfalls die Lokalisation der Bindungstasche zwischen den TM III, V und VI nachgewiesen werden, für eine Beteiligung der TM VII wurde keinen Hinweis gefunden (Sakurai et al., 2010).

Nygaard beschreibt zusammenfassend, dass die Bindungstaschen der verschiedenen GPCRs eine trichterartige Form haben und mit einem Deckel, welcher aus der zweiten extrazellulären Schleife (ECL) gebildet wird, partiell abgedeckt sind. Auch bei den TAS2Rs scheinen die extrazellulären Schleifen nicht nur verbindendes Element zu sein, auf das ich im nächsten Kapitel eingehen möchte.

## 4.2 Bedeutung der extrazellulären Schleifen von TAS2Rs

Um die Bedeutung der drei extrazellulären Schleifen (ECLs) beim TAS2R14 für den Zugang zur Bindungstasche näher zu charakterisieren, wurden drei Rezeptorchimären des TAS2R14 mit einzelnen, extrazellulären Schleifen des TAS2R13 und eine weitere Rezeptorchimäre mit allen extrazellulären Schleifen und dem N-Terminus des TAS2R13 erstellt.

Im Vergleich zum TAS2R14-Wildtyp und zu den Rezeptorchimären mit einem Austausch der einzelnen ECLs zeigte die Rezeptorchimäre mit dem Austausch der ECL1 die geringste Sensitivität für alle Testsubstanzen mit Ausnahme von Santonin, wo die Chimäre mit dem Austausch des zweiten ECLs die geringste Sensitivität aufwies.

Das Ergebnis der Analyse der Austausche einzelner ECL passt zu der Vermutung von Brockhoff *et al.* 2010, dass die Position E70 der ersten ECL für die „Zugangskontrolle“ für Substanzen in die Bindungstasche wichtig ist (Brockhoff et al., 2010). Sandal und Kollegen identifizierten die ECL-Position E70 als Teil einer vestibulären Bindungsstelle des TAS2R46 (Sandal et al., 2015). Die extrazellulären Schleifen der Bitterrezeptoren sind in ihrer Aminosäuresequenz sehr variabel (Meyerhof et al., 2005b), so ist auch die Position E70 des TAS2R46 ist nicht konserviert innerhalb der TAS2Rs. Im TAS2R14 ist an dieser Stelle ein Valin (V) und beim TAS2R13 ein Leucin (L), welches beide unpolare Aminosäuren sind und somit stark von den Eigenschaften der Glutaminsäure des TAS2R46 abweichen. Möglicherweise ist dies ein Grund für das spezifische Agonistenspektrum der verschiedenen Bitterrezeptoren.

Bei der Untersuchung der zweiten extrazellulären Schleifen war auffällig, dass die Chimäre des TAS2R13 mit der zweiten ECL des TAS2R14 den stärksten, statistisch signifikanten Rückgang der Expressionseffizienz mit  $0,6 \pm 0,6 \%$  verglichen mit dem Wildtyp TAS2R13 mit  $4,9 \pm 2,0 \%$  und Wildtyp TAS2R14 mit  $14,4 \pm 3,4 \%$  hat. Dieses könnte im Zusammenhang mit dem Motiv für die Asparagin (N)-Glykosylierungsstellen in TAS2Rs stehen (Reichling et al., 2008). Bei GPCRs wurde gezeigt, dass die Glykosylierung einen Einfluss auf den Transport und die richtige Faltung haben ( $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor (Rands et al., 1990), Type-1 Angiotensin II Rezeptor (AT1aR) (Shukla et al., 2006), Follikel-stimulierender Hormonrezeptor (FSHR) (Davis et al., 1995).

Im Rezeptor TAS2R14 handelt es sich um die Positionen N162 und N171, welche im Aminosäuresequenz-Alignment (siehe Anhang: 10.8) im TAS2R13 den Aminosäurepositionen T164 und D171 entsprechen. Da die Sequenzen innerhalb der ECLs sehr unterschiedlich sind, kann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen den Positionen hergestellt werden. Als N-Glycosylierungsstellen könnten im TAS2R13 die Position N162 und N166 in Frage kommen. Interessanterweise, hat der umgekehrte Austausch, TAS2R14 mit dem zweiten ECL des TAS2R13, eine Expressionseffizienz von  $11,5 \pm 1,0 \%$  und ist statistisch gleich mit dem TAS2R14-Wildtyp.

Bei dem Austausch des ECL3 konnte eine Verschlechterung der Aktivierung (also Verringerung der Maximalamplitude) durch vier Testsubstanzen (Aristolochiasäure, Flufenaminsäure, Pikrotoxinin und Santonin) festgestellt werden. Nur bei der Aktivierung durch Parthenolid kam es zu einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, ein Verhalten, das den Eigenschaften der Chimäre des ECL1-Austausches ähnlich war.

Die Analysen der TAS2R14-Rezeptorchimäre mit allen extrazellulären Bereichen des TAS2R13 (**TAS2R14\_NTerm\_ECL123**) zeigte bei allen Testsubstanzen die stärkste Rechtsverschiebung verglichen mit den Chimären mit Austausch der einzelnen ECLs sowie zum TAS2R14 Wildtyp. Des Weiteren ist der Einfluss auf die Rezeptoraktivierung durch die modifizierten ECLs agonistenspezifisch, so kann z.B. Aristolochiasäure die Rezeptorchimäre mit allen TAS2R13-ECLs mit einem höheren Schwellenwert, aber gleicher Maximalamplitude verglichen zum Wildtyp-TAS2R14 aktivieren. Somit scheinen die TAS2R13-ECLs den Zugang zur Bindungstasche zu erschweren.

Während dessen kann die kleinere Substanz Parthenolid diese Rezeptorchimäre nur gering mit  $13 \%$  bei der höchsten messbaren Konzentration verglichen zum Wildtyp-TAS2R14 aktivieren. Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt keine Sättigung, so dass der  $EC_{50}$ -Wert nicht bestimmbar war. Dabei könnte Parthenolid mit den extrazellulären Schleifen des TAS2R13

möglicherweise eine Interaktionsmöglichkeit fehlen, oder sie könnten eine störende Eigenschaft für Parthenolid aufweisen und somit den Zugang in die Bindungstasche sehr stark erschweren.

Der Austausch der extrazellulären Schleifen allein reicht nicht aus, um den TAS2R14 durch den TAS2R13-Agonisten Denatoniumbenzoat zu aktivieren. Prolin et al. gelang durch Übertragung der extrazellulären Schleifen die Aktivierung der TAS2R31-Chimäre mit den ECLs 1 und 2 des TAS2R43 durch den TAS2R43-Agonist 6-Nitrosaccharin (Pronin et al., 2004). Für das Gelingen der Übertragung der Aktivierbarkeit durch TAS2R43-Agonist 6-Nitrosaccharin können zwei Gründe aufgeführt werden. Erstens, die beiden Rezeptoren sind mit 89,3% ähnlicher als TAS2R13 zu TAS2R14 und daher besteht eine größere funktionelle und strukturelle Ähnlichkeit der Bindungstaschen. Dadurch könnte es ausreichen die extrazellulären Bereiche der beiden Rezeptoren auszutauschen, um die Aktivierbarkeit durch den TAS2R43-Agonist zu übertragen. Zweitens, die Bereiche des Sequenzaustausches wurden zu groß gewählt und somit wurden wichtige interagierende Anteile der Bindungstasche mit ausgetauscht.

Nach genauer Prüfung der ausgetauschten Sequenzabschnitte zeigte sich, dass Pronin et al. den Bereich für die ECL1 (73 -96 AS) und ECL2 (150 - 184) größer gewählt haben und somit möglicherweise ein Teil der Bindungstasche selbst mit ausgetauscht wurde. In diesem Bereich befinden sich die Positionen **3.29** (TAS2R14 T86) **3.33** (TAS2R14 T90) und **3.36** (TAS2R14 N93), welche im TAS2R14 laut dieser Arbeit zur Bindungstasche gehören und auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird.

### 4.3 Charakterisierung des TAS2R14 und seiner Bindungstasche

Die Untersuchung der Struktur- und Funktionsbeziehungen des TAS2R14 wurde durch gezielte Rezeptormodifikationen mit der PCR-basierten Mutagenese und anschließender funktioneller Analyse unter Verwendung eines heterologen Expressionssystems durchgeführt. Dabei gelang die Identifizierung von acht Positionen (**T86**<sup>3.29</sup>, **W89**<sup>3.32</sup>, **T90**<sup>3.33</sup>, **N93**<sup>3.36</sup>, **F186**<sup>5.46</sup>, **F243**<sup>6.51</sup>, **F247**<sup>6.55</sup> und **Q266**<sup>7.39</sup>), welche in der Bindungstasche mit den Testsubstanzen interagieren können.

Diese Interaktionen sind alle agonistenspezifisch, d. h. es zeigte sich bei einigen Agonisten nicht zu jeder dieser Positionen eine Interaktion.

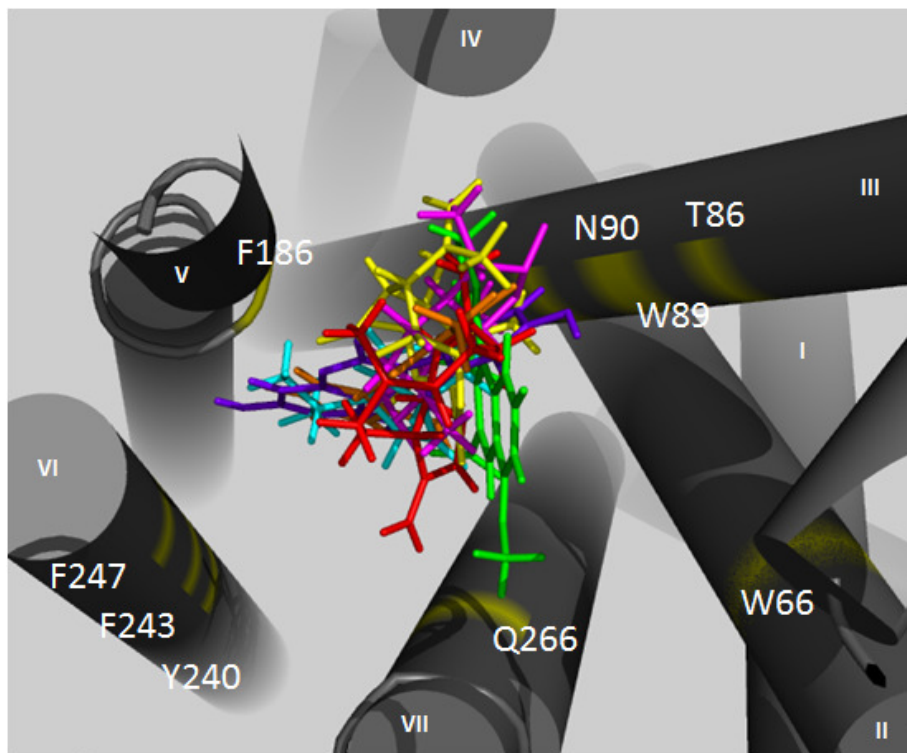


Abbildung 44: Docking-Modell von allen Testsubstanzen

Die Abbildung zeigt den Bitterrezeptor TAS2R14 als Säulenmodell (grau) mit wichtigen Aminosäuren (gelb) der Bindungstasche. In der Bindungstasche sind die 7 getesteten Agonisten (Aristolochiasäure (grün), Flufenaminsäure (orange), Pikrotoxinin (gelb), Santonin (magenta), Parthenolid (rot), Thujon (cyan) und Genistein (lila)) dargestellt.

Das Ergebnis spiegelt sich auch in den Docking-Modellen wieder (siehe Ergebnisteil, Abbildungen 24 – 28, 30 und 31) und ist in der Abbildung 44 zusammenfassend dargestellt. Die Agonisten liegen teilweise mit sehr unterschiedlichen Ausrichtungen in der Bindungstasche. Besonders anschaulich konnte dies für die drei Sesquiterpenlactonen (Pikrotoxinin, Santonin und Parthenolid) gezeigt werden, welche mit dem doppeltgebundenen Sauerstoff des Laktonrings zu verschiedenen Aminosäuren in der Bindungstasche ausgerichtet sind (siehe Ergebnisteil, Abbildung 29).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Natur der Interaktion unterscheidet, je nachdem welcher Agonist involviert ist. Bei der Aktivierung des TAS2R14 durch Aristolochiasäure und Flufenaminsäure beispielsweise lassen die Untersuchungen der verschiedenen TAS2R14 Punktmutanten auf eine  $\pi$ -Elektronen-Interaktion zwischen den Agonisten und dem Phenylring der Aminosäure **F247**<sup>6,55</sup> schließen. Pikrotoxinin, Thujon, Santonin und Genistein aktivieren den Rezeptor mit Valin (unpolar) an dieser Position ähnlich wie den Wildtyp oder sogar besser. Daher kann man in diesem Fall von einer hydrophoben Interaktion ausgehen. Parthenolid hingegen aktiviert die Alanin-Mutante wie den Wildtyp, daraus lässt sich schließen, dass keine Interaktion mit dieser Position stattfindet.

Solch eine agonistenspezifische Interaktion konnte sowohl bei TAS2R14 an der Position **T86**<sup>3,29</sup>, als auch bei TAS2R10 an der homologen Position **S85**<sup>3,29</sup> gezeigt werden (Born et al., 2013). Die funktionellen Analysen mit Santonin und Pikrotoxinin lieferten den Hinweis, dass diese Agonisten mit der Hydroxylgruppe über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rest **T86**<sup>3,29</sup> im Rezeptor TAS2R14 interagieren. Beim TAS2R10 konnte eine Interaktion zu Strychnin und Denatoniumbenzoat in den funktionellen Analysen festgestellt werden (Born et al., 2013). Innerhalb der GPCRs wurde die Position nur noch beim Purinorezeptor P2Y1 (**R128**<sup>3,29</sup>) im Zusammenhang mit der Aktivierung durch den Agonisten 2-methylthio-ATP erwähnt (Jiang et al., 1997). Das Serin im TAS2R10 und das Threonin im TAS2R14 sind bis auf eine zusätzliche Methylgruppe beim Threonin und dem polaren Charakter sehr ähnlich, jedoch unterscheidet sich die basische Aminosäure Arginin des Purinorezeptors P2Y1 sowohl in ihrer Größe als auch von ihren Eigenschaften. Im Aminosäuresequenz-Alignment (siehe Anhang: 10.8) zeigt sich keine hohe Konservierung der Aminosäuren an der Position 3.29. Nur 12 der 25 humanen Bitterrezeptoren tragen eine Aminosäure mit einer Hydroxylgruppe. Diese Position scheint sehr rezeptorspezifisch zu sein und ein Grund für das jeweilig angepasste Agonistenspektrum.

Eine weitere Position **Q266**<sup>7,39</sup> konnte auch im TAS2R46 (**E265**<sup>7,39</sup>) als wichtige Position in der Bindungstasche identifiziert und bestätigt werden. Im TAS2R10 konnte die punktmutierte Rezeptorvariante an der homologen Position **M263**<sup>7,39</sup> nicht mehr aktiviert werden, wodurch unklar bleibt, ob die Position für die Interaktion benötigt wird oder ob die Mutation an sich den Rezeptor beispielsweise bei der korrekten Faltung gestört hat.

Beim TAS2R14 konnten alle punktmutierten Rezeptorvarianten der Position **Q266**<sup>7,39</sup> durch alle Testsubstanzen aktiviert werden, so dass auf eine korrekte Faltung geschlossen werden kann. Dabei konnte man die verschlechterte Aktivierbarkeit einzelner Punktmutanten direkt in funktionellen Zusammenhang mit der Interaktion zu der Position bringen. Daher sprechen die funktionellen Daten für eine Interaktion zwischen der Position **Q266**<sup>7,39</sup> und den Substanzen Pikrotoxinin, Thujon und Santonin. Nach der Erkenntnis über die Bedeutung der homologen Position beim TAS2R14 und -R46, kann nun davon ausgegangen werden, dass auch im TAS2R10 diese Position für die Interaktion der Agonisten von hoher Bedeutung und dass die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung gering ist.

Um die Lokalisation und die Gestalt der Bindungstasche zu bestätigen, sollte das Agonistenspektrum des TAS2R14 auf den TAS2R13 übertragen werden, wie beispielsweise zwischen den Rezeptoren TAS2R31 und -R46 (Brockhoff et al., 2010). Gleichzeitig sollte der strukturelle Unterschied zwischen breiten und eng eingestellten Rezeptoren heraus gearbeitet werden. Um dies zu erreichen, wurden wichtige Aminosäuren der Bindungstasche des

TAS2R14 durch Punktmutation im TAS2R13 verändert. Wie erwartet verlor der TAS2R13 die Aktivierbarkeit durch die TAS2R13-Agonisten. Jedoch gelang die Aktivierung der TAS2R13 durch TAS2R14-Agonisten nicht. Da die Aminosäuresequenz des TAS2R13 und -R14 nur 46,7% Ähnlichkeit besitzen, müssen möglicherweise noch essenziellen Aminosäurepositionen im Rezeptor TAS2R13 verändert werden, um die Funktion des TAS2R14 zu übertragen.

Während der laufenden Untersuchungen zeigte sich, dass die Bindungstasche des TAS2R14 sehr stabil gegenüber den Rezeptormodifikationen an den Positionen **2.61** (TAS2R14 **W66**), **3.32** (TAS2R14 **W89**), **3.36** (TAS2R14 **N93**) und **3.37** (TAS2R14 **H94**) ist, ein Befund, der im nächsten Unterkapitel diskutiert wird (Kapitel: 4.3.1).

#### 4.3.1 Stabilität der TAS2R14-Funktion gegenüber Rezeptormodifikationen

Vergleicht man die Analysen der Bindungstaschen der verschiedenen Rezeptoren, so ist auffällig, dass die Punktmutagenese der homologen Positionen **2.61** (TAS2R14 **W66**), **3.32** (TAS2R14 **W89**), **3.36** (TAS2R14 **N93**) und **3.37** (TAS2R14 **H94**) häufig zum Funktionsverlust der Bitterrezeptoren führten (Born et al., 2013; Brockhoff et al., 2010; Sakurai et al., 2010).

Beim TAS2R10 zeigten die Rezeptormutanten an den Positionen **W88**<sup>3.32</sup>, **N92**<sup>3.36</sup> und **Q93**<sup>3.37</sup> keine Aktivierung durch die Testsubstanzen: Strychnin, Parthenolid und Denatoniumbenzoat (Born et al., 2013). Beim TAS2R16 mit einer Punktmutation an der Position **N89**<sup>3.32</sup> konnte dieser durch Salicin nicht mehr aktiviert werden (Sakurai et al., 2010). Der TAS2R46 mit der Punktmutation **W66**<sup>2.61</sup> war ebenfalls nicht mehr funktionell (Brockhoff et al., 2010).

Der TAS2R14 mit Punktmutationen an den Positionen **W66**<sup>2.61</sup>, **W89**<sup>3.32</sup>, **N93**<sup>3.36</sup> und **H94**<sup>3.37</sup> kann jedoch durch mindestens drei Substanzen aktiviert werden und ermöglicht somit Rückschlüsse über die funktionelle Bedeutung dieser Positionen.

Die Messung der Alaninmutante der Position **W66**<sup>2.61</sup> zeigt mit allen 7 Testsubstanzen eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven, jedoch keinen Verlust der Aktivierbarkeit. Interessanterweise konnte durch die beiden Vollagonisten, Aristolochiasäure und Flufenaminsäure die statistisch gleiche maximale Amplitude wie bei dem Wildtyp erreicht werden. Für Parthenolid war die Maximalamplitude sogar mit 157 % verbessert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Aminosäurereste an der Agonistenbindung beteiligt sind, ohne dass es zu Problemen bei der Faltung des Moleküls kommt.

Auch bei der detaillierten Punktmutagenese, die der Alaninmutagenese folgte, war es auffällig, dass der Rezeptor seltener Aktivierungsverluste zeigte als beispielsweise der

TAS2R10 (Born et al., 2013). Dies kann in der optimierten Anordnung der einzelnen Aminosäuren, welche als Interaktionspartner in Frage kommen, oder in der Anzahl der potentiellen Interaktionspartner in der Bindungstasche begründet sein. Denkbar sind dabei Wasserstoffbrückenbindungen mit  $\pi$ -Akzeptoren oder auch  $\pi$ - $\pi$ -Stapel innerhalb des Rezeptors (Steiner 1998 und 2001; Brandl 2001).

Innerhalb von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnten bereits stabilisierende Interaktionen innerhalb der Rezeptoren bei kleinen Bewegungen (Micro-switches) bei der Aktivierung identifiziert werden (Nygaard 2009). Dabei zeigten die Aminosäure Phenylalanin (**F**)<sup>5.47</sup> des Rhodopsins mit dem Agonisten und der Aminosäure Tyrosin (**Y**)<sup>6.51</sup> eine Stapelbildung und interagieren mit der Aminosäure Tryptophan (**W**)<sup>6.48</sup> (Cherezov et al., 2007). Die Untersuchung vom TAS2R14 zeigt eine Interaktion beispielsweise zu Santonin mit den Aminosäuren **F186**<sup>5.46</sup> und **F243**<sup>6.51</sup>. Eine stabilisierende Interaktion ausgehend von dieser Stapelbildung zur Aminosäure **Y240**<sup>6.48</sup> scheint auch hier denkbar, welche durch die funktionellen Analysen und daraus resultierenden Abständen der Aminosäuren in den Docking-Modellen mit der Möglichkeit der  $\pi$ -Elektronen-Interaktion unterstützt wird.

In den anderen TAS2Rs, mit Ausnahme von -R3, R8, R13 und -R38, befinden sich an der Position **5.46** nur unpolare, aliphatische Aminosäuren, welche keine  $\pi$ -Elektronen-Interaktionen zur Position **6.48** zur Stabilisierung der Rezeptoren eingehen können (siehe Aminosäuresequenz-Alignment im Anhang: 10.8). Somit fehlt den Rezeptoren TAS2R10 und -R46 möglicherweise dieser und weitere stabilisierende Effekt, wodurch sich erklären ließe, dass beide Rezeptoren bei Punktmutationen einzelner Aminosäure beispielsweise **W88**<sup>3.32</sup> nicht mehr aktiviert werden können (Born et al., 2013; Brockhoff et al., 2010).

Die Untersuchungen des TAS2R38, welcher an der homologen Position **5.46** ein Tryptophan (**W**) hat, also eine aromatische Gruppe wie der Bitterrezeptor TAS2R14, lässt sich bei einer Punktmutation von der homologen Position **W99**<sup>3.32</sup> immer noch aktivieren (Biarnes et al., 2010; Marchiori et al., 2013), welches ein weiteres Indiz für die oben genannte Vermutung liefert.

Die Analysen der Docking-Modelle des TAS2R14 zeigten weiterhin, dass die Verschlechterung der Aktivierung der Punktmutanten an der Position **W66**<sup>2.61</sup> keine Folge von fehlender direkter Interaktion darstellen kann. Die Aminosäure **W66**<sup>2.61</sup> scheint über einen  $\pi$ -Elektronen-Interaktion mit **W89**<sup>3.32</sup> in Wechselwirkung zu stehen und somit indirekt die Interaktion einiger Agonist zur Aminosäure **W89**<sup>3.32</sup> zu stabilisieren.

Eine aktuelle Publikation des olfaktorischen G-Proteingekoppelten-Rezeptoren, TAAR13c, beschrieb die Position **3.32** (TAAR13c **D112**<sup>3.32</sup>) als zentralen Bestandteil der



Bindungstasche, da fast alle punktmutierten TAAR13c-Rezeptoren an dieser Position die Aktivierbarkeit verloren haben (Sharma et al., 2016).

Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass sich die Stabilisierung des TAS2R14 über solch ein optimaleres Wasserstoffnetzwerk ergibt und somit direkt interagierende Aminosäuren stabilisiert. Dies gibt jedoch keinen Hinweis darauf, warum der TAS2R14 durch so viele Agonisten aktiviert werden kann. Denkbar ist, dass der Rezeptor über eine hohe Flexibilität der Anordnung der einzelnen Aminosäurereste besitzt (Kapitel: 4.3.2) und sich daraus das große Agonistenspektrum begründen ließe.

#### 4.3.2 Flexibilität der TAS2R14-Bindungstasche

Der TAS2R14 ist, wie andere Proteine auch, in sich beweglich. Das wurde am Cytochrom c untersucht (Baldwin, 1995). Aber wie flexibel ist die Bindungstasche? Ist es möglich, dass sich zu große Seitengruppen aus der Bindungstasche herausdrehen und optimalere Interaktionsbedingungen für Agonisten schaffen können? Kann somit die Existenz des großen Agonistenspektrums des TAS2R14 begründet werden?

Nach der anfänglichen Annahme, Proteine seien relativ starre Gebilde und deren Faltungsprozess liefen immer gleichmäßig ab, kam eine „neue Sichtweise (new view)“ auf (Baldwin, 1995). Diese resultierte aus der Entdeckung der verschiedenen Faltungs-Zwischenstufen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Des Weiteren entdeckte man, dass Proteine generell in wässriger Lösung eine starke Beweglichkeit besitzen. Besonders die Aminosäureseitenketten zeigen eine hohe Mobilität (Cavanagh, 1996; Davis et al., 2006; James et al., 2003; Kay, 2005). Tokuriki und Tawfik sprachen von einem „Ensemble von alternativen Substrukturen“ (Tokuriki et al., 2009).

Diese Erkenntnis wurde auch auf die GPCRs übertragen. Preininger et al. fasst die Ergebnisse verschiedener Studien, sowohl NMR-Untersuchungen als auch *in silico* Analysen, zusammen und spricht von einer „dynamischen Ligandenbindung“ (Preininger et al., 2013). Entscheidend für die Bindungsdynamik scheint hierbei die Zugangsgeschwindigkeit der Agonisten zu sein, wodurch eine Änderung der Interaktion zwischen den Aminosäureresten innerhalb eines Rezeptors vermutet wird und somit der Rezeptor unterschiedlich stabilisiert wird (Lee et al., 2012).

Die Untersuchungen des Bitterrezeptors TAS2R14 zeigten, dass die Interaktion für die Substanzen Pikrotoxinin, Santonin und Thujon mit der Position der **Q266**<sup>7,39</sup> wichtig für die Aktivierung des Rezeptors ist. Für die Agonisten Aristolochiasäure, Flufenaminsäure,

Parthenolid und Genistein an der Position **Q266**<sup>7,39</sup> ist Glutamin nicht notwendig, um den Rezeptor mit gleicher Sensitivität und Effektivität zu aktivieren. Eine andere Aminosäure wie z. B. Glutaminsäure und Asparagin wirkt hingegen störend auf die Aktivierbarkeit und muss sich daher in der Bindungstasche befinden. Daraus lässt sich schließen, dass Aminosäuren mit störenden Effekten nicht durch Rotation des Aminosäurerestes aus der Bindungstasche gedreht werden können. Auch das Phenylalanin der Position **F243**<sup>6,51</sup> zeigt demnach immer in die Bindungstasche. Die Aminosäure wird von Aristolochiasäure, Flufenaminsäure und Genistein für die Interaktion nicht gebraucht, ein Tyrosin wirkt sich jedoch ungünstig auf die Interaktion aus.

Daraus lässt sich schließen, dass der Rezeptor nicht flexibel genug ist, um daraufhin das große Agonistenspektra zu begründen. Möglicherweise ist es die Gestaltung der Bindungstasche selbst, die es erlaubt, dass der Rezeptor TAS2R14 durch so viele verschiedene Substanzen aktiviert wird (siehe Kapitel: 4.3.3).

### 4.3.3 Anpassung der Bindungstasche für die Erkennung von vielen Agonisten

Der TAS2R14 kann durch sehr viele chemisch unterschiedliche Substanzen aktiviert werden und zählt somit zu den Generalisten, ebenso wie der Bitterrezeptor TAS2R10 (Born et al., 2013). Während der funktionellen Untersuchungen der Punktmutanten war auffällig, dass einige Substanzen den punktmutierten Rezeptor mit geringerer Konzentration aktivieren konnten im Vergleich zur Aktivierung des Wildtyprezeptors (siehe Alanin-Punktmutagenese in der Tabelle 3

Tabelle 3 und die Ergebnisse der weiterführenden Punktmutagenese in der Tabelle 4).

Diese Verbesserung der Rezeptoraktivierung trat bei 6 untersuchten Positionen der Bindungstasche (Position: **T86**<sup>3,29</sup>, **W89**<sup>3,32</sup>, **I187V**<sup>5,47</sup>, **F247**<sup>6,55</sup>, **Q266**<sup>7,39</sup> und **269**<sup>7,42</sup>) mit unterschiedlichen Testsubstanzen auf. Beispielsweise konnten die Mutanten **T86A** und **T86S** durch Parthenolid und **T86S** durch Thujon mit einer besseren Effizienz als der Wildtyp aktiviert werden.

Somit ist auch beim TAS2R14, wie beim TAS2R10 (Born et al., 2013), die Bindungstasche für die Aktivierung durch viele verschiedene Substanzen maßgeschneidert. Dabei ist nicht jede Aminosäure der Bindungstasche ideal für alle Agonisten, wodurch die Affinität für einzelne Substanzen vermindert ist.

Interessanterweise konnte diese Entdeckung auch bei dem Austausch der dritten extrazellulären Schleife des TAS2R14 gegen die des TAS2R13 beobachtet werden. Dabei

verbesserte sich der Zugang für die Substanzen Aristolochiasäure und Santonin (Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve). Die Schlussfolgerung daraus ergibt, dass nicht jede extrazelluläre Schleife im Zusammenspiel mit den anderen Schleifen optimal für einzelne Agonisten abgestimmt ist. Der Rezeptor ist auch bei den Zugangsbedingungen an möglichst viele Agonisten angepasst, auch wenn sie für einige Agonisten nicht ganz ideal sind (siehe Abbildung 33 und Tabelle 6).

Vergleicht man die einzelnen Substanzen bei der Betrachtung aller untersuchten Positionen der Bindungstasche, so fällt auf, dass alle Substanzen außer Santonin mindestens bei einer Alanin-Punktmutante eine Linksverschiebung der  $EC_{50}$ -Werte aufweisen. Santonin hingegen aktiviert die Mutanten zweimal wie der Wildtyp und zeigt in 17 von 19 Fällen eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve, also eine verschlechterte Sensitivität. Daraus lässt sich schließen, dass die Wildtypaminoacids der Bindungstasche des TAS2R14 für Santonin am besten angepasst sind.

Die zuverlässige geschmackliche Erkennung Santonin oder ähnliche Moleküle könnte bei unseren Vorfahren wichtig gewesen sein, um Vergiftungen zu vermeiden. Die Erkennung von Santonin ist nicht nur durch den Bitterrezeptor TAS2R14 abgesichert, sondern die Substanz kann auch die Rezeptoren TAS2R10 (Born et al., 2013) und TAS2R46 (Brockhoff, 2009) aktivieren. Santonin kann aus einer Pflanze namens Wurmsamen (*Artemisia santonica*) gewonnen werden. Heutzutage kommt diese Pflanze in Mittelasien, Kasachstan und Kirgisistan, und in China vor (Datenbank: „U.S. National Plant Germplasm System“ <https://npgsweb.ars-grin.gov/>). Möglicherweise war Wurmsamen früher stärker verbreitet, was sich durch andere klimatische Bedingungen begründen ließe (Hoek et al., 1997; Holm et al., 2014). Denkbar wäre ein Zusammenhang zwischen stärker Ausbreitung von Wurmsamen und der Ausbreitungswelle der menschlichen Vorfahren in Richtung Europa vor 50 000 bis ca. 40 000 Jahren (Witas et al., 2004). Dabei ist Santonin nur ein Beispiel für viele verschiedene Substanzen und nimmt keine Sonderstellung ein. Weitere Agonisten, welche alle drei TAS2Rs mit breitem Agonistenspektrum aktivieren (Meyerhof et al., 2010), sind einerseits natürlich vorkommende Substanzen, wie Absinthin (ebenfalls aus *Artemisia Santonica*), Arglabin (*Artemisia glabella* (Adekenov et al., 1982)), Artemorin (*Artemisia ludoviciana spec.*) (Ruiz-Cancino et al., 1993), Chinin (*Cinchona pubescens*), Cascarillin (*Croton eluteria* (Appendino et al., 2003)), Koffein (*Coffea Arabica* (Ashihara et al., 1996)), Parthenolid (*Tanacetum parthenium* (Pareek et al., 2011)), Pikrotoxinin (*Anamirta cocculus* (Weikert et al., 2008)), Quassin (*Quassia spec.* (Mishra et al., 2010)) und andererseits synthetisch hergestellte Verbindungen, wie Arborescin (Ando et al., 1982), Azathioprin

(Kochergin et al., 1965), Chlorpheniramin (Vardanyan et al., 2006) und Diphenidol (Lednicer, 2007). Bei den natürlich vorkommenden Substanzen kann, wie bei Santonin, die vorliegende Aktivierbarkeit des TAS2R14 evolutionäre Gründe haben. Im Falle der synthetisch hergestellten Verbindungen kann dies durch strukturähnliche, natürlich vorhandene Substanzen begründet werden. Denkbar ist, dass der Mensch und seine Vorfahren im Laufe der Evolution mit vielen neuartigen Substanzen in Kontakt kamen und sich dadurch beispielsweise der TASR14 zum Generalist entwickelt hat und somit die Grundlage geschaffen wurde, dass der TAS2R14 auch auf neuartig-synthetisch hergestellte Verbindungen reagieren kann.

Obwohl der TAS2R14 basierend auf dem 1000-Genom-Projekt drei häufige Haplotypen mit unterschiedlicher Verteilung innerhalb der Weltbevölkerung hat, zeigen die drei Haplotypen eine gleichstarke Sensitivität gegenüber allen experimentell getesteten TAS2R14-Agonisten (mündliche Kommunikation durch Natacha Roudnitzky 2016). Dies liefert einen Hinweis für die hohe Bedeutung des TAS2R14 und seiner Agonisten innerhalb der Weltbevölkerung.

Im Vergleich dazu gibt es beim TAS2R46 unter den drei häufigsten Haplotypen starke Unterschiede in der Aktivierbarkeit und in der Verteilung innerhalb der Weltbevölkerung. Der zweithäufigste Haplotyp ist sogar eine nichtfunktionelle Variante.

Dieser Unterschied der Sensitivität der funktionellen TAS2R46-Haplotypen scheint eine regionale Anpassung an die Erkennung von weiteren Agonisten zu sein, welche sich beim TAS2R14 durch seine hohe Anpassung an die Erkennung von vielen Substanzen evolutionär nicht ergeben hat.

Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften der Agonisten näher diskutiert und auf die Besonderheiten der pharmakologischen Wirkung eingegangen.

## **4.4 Agonisteneigenschaften der Bitterrezeptoren**

### **4.4.1 Strukturelle Beschaffenheit der TAS2R14-Agonisten**

Der Bitterrezeptor TAS2R14 kann durch eine Vielzahl von Bittersubstanzen mit einer hohen strukturellen Diversität aktiviert werden (Behrens et al., 2004; Meyerhof et al., 2010; Sainz et al., 2007) und somit kann er wie beispielsweise der TAS2R10 als Generalist bezeichnet werden (Born et al., 2013).

Zur Aufdeckung möglicher gemeinsamer Merkmale der Agonisten wurden verschiedene Pharmakophormodelle, 3D ligandbinde Pharmakophormodelle (LBP-Modell), 3D struktur-

basierte Modelle (OBP-Modell) und 3D oberflächenbasierte Modelle (SBP-Modell), analysiert (Kapitel: 3.2.1). Diese ermöglichten die Vorhersage von weiteren TAS2R14-Agonisten (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014). Die Analysen ergaben, dass die Agonisten des TAS2R14 ein Molekulargewicht von 100 bis 600 g/mol aufweisen, 0 -3 aromatische Ringe tragen, 2 bis 7 Wasserstoffakzeptoren haben, 0 bis 3 Wasserstoffdonatoren, 0 bis 10 rotierbare Bindungen und 0 bis 1 Formalladung (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014).

Interessanterweise konnten mit den verschiedenen Modellen unterschiedliche TAS2R14-Agonisten vorhergesagt werden. Das Agonistenspektrum scheint so divers zu sein, dass ein einzelnes Pharmakophormodell diese Vielfalt nicht abdecken kann. Es existieren also mehrere Grundstrukturen für TAS2R14-Agonisten.

Um einen Zusammenhang zwischen Agonistenstruktur und dem pharmakologischen Verhalten aufzudecken, wurde die Dosisabhängigkeit der Rezeptoraktivität von 25 Agonisten in einer Rangliste zusammengestellt (Tabelle 7). Die Rangliste zeigt, dass Substanzen mit aromatischen Ringsystemen eher den TAS2R14 aktivieren als aliphatische Substanzen. Wenn Substanzen mit aliphatischer Struktur den TAS2R14 aktivieren, dann weisen sie verzweigte Strukturen auf (z.B. Tributyrin oder Triethylcitrat).

Auffällig war, dass viele Agonisten zur Gruppe der Benzoesäuren gehören. Jedoch spielt es eine große Rolle, welche weiteren funktionellen Gruppen bei der Substanz zu finden sind. Vergleicht man 3,5-Diiodsalicylsäure mit Natriumbenzoat, so ist auffällig, dass 3,5-Diiodsalicylsäure mit der zusätzlichen Hydroxylgruppe und den zwei Jodatomen einen Schwellenwert von 0,3  $\mu\text{M}$  hat und somit in der Rangliste auf Platz 5 steht. Natriumbenzoat hingegen ist mit einem Schwellenwert von 1000  $\mu\text{M}$  auf dem 24ten Platz. Benzoesäuren mit weiteren aromatischen Ringen wie Flufenaminsäure und Nifluminsäure sind in der Rangliste mit einem kleinen Schwellenwert weit vorn. Entscheidend sind die unterschiedlichen funktionellen Gruppen von denen mesomeren Effekte ausgehen, welche einen Einfluss auf die Elektronenverteilung haben und somit die Eigenschaften des gesamten Moleküls beeinflussen (McNaught et al., 1997).

Auch bei der Aktivierung des TAS2R46 mit Sesquiterpenlactonen zeigten sich starke Unterschiede der Schwellenwerte zwischen 0,03 – 100  $\mu\text{M}$ , je nachdem welche strukturellen Anhänge am Grundgerüst vorliegen (Brockhoff et al., 2007).

Um mehr über die funktionellen Auswirkungen von Derivaten der TAS2R14-Agonisten zu erfahren, wurden gezielt Strukturveränderungen an den Agonisten angebracht und auf ihre Aktivierungseigenschaften untersucht. Dazu wurden von 5 Ausgangsagonisten zwei bis sechs Derivate hergestellt (Karaman et al., 2016). Sowohl kleine, als auch größere Veränderungen

an den Agonisten des TAS2R14 zeigten nur in zwei Fällen (Coumarin Derivat C2 und Diclofenac Derivat D3) einen Aktivierungsverlust. Im Gegenteil konnten die Derivate den Rezeptor TAS2R14 oft besser aktivieren. Interessanterweise bietet die Bindungstasche genug Raum, um auch größere Modifikationen, wie beispielsweise die Veresterung mit einem Benzylrest oder das Anhängen eines Glutamatrests an den TAS2R14-Agonisten zu tolerieren. Beispielsweise tragen die großen Anhänge der Guaifenesin-Derivate Guaifenesindimalat (G3) und Guaifenesindibenzylether (G6) zur Aktivierung des TAS2R14 schon mit geringerer Konzentration verglichen mit der Aktivierung durch die Ausgangssubstanz Guaifenesin bei. Betrachtet man die Gesamtheit der getesteten Derivate, so fällt auf, dass meist die Aktivierung des TAS2R14 erhalten bleibt und somit die Erkennung von Substanzen auch mit kleineren, aber auch größeren Modifikation für den Menschen evolutionär von Bedeutung zu sein scheint, so dass auch modifizierte Agonisten als bitter identifiziert werden können. Auf die Eigenschaften und mögliche Bedeutungen des menschlichen Bittergeschmacks und die möglicherweise hohen Bedeutung des TAS2R14 möchte ich im nächsten Kapitel eingehen.

#### **4.4.2 Pharmakologische Wirkung der TAS2R14-Agonisten**

Im Laufe der Arbeit wurden zu den schon bekannten pharmakologisch wirkenden Agonisten (Behrens et al., 2004; Meyerhof et al., 2010) weitere Wirkstoffe als Agonisten des TAS2R14 identifiziert (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014). Zu den Wirkstoffen gehören beispielsweise sehr viele Substanzen mit antientzündlicher Wirkung wie Diclofenac (Beck et al., 2003) und Psychopharmaka wie Haloperidol (Glick et al., 2001). Des Weiteren konnten Substanzen mit antiallergischer Wirkung wie Pemirolast, mit antioxidativer Wirkung wie Quercetin und Substanzen mit krebshemmender Wirkung wie Parthenolid (Guzman et al., 2005) den TAS2R14 aktivieren.

Diese Feststellung führte zu der Frage, ob der TAS2R14 eine Sonderstellung unter den Bitterrezeptoren einnimmt und möglicherweise die Aktivierung des TAS2R14 als Indikator zur Vorhersage für pharmakologische Effekte angesehen werden kann. Einerseits könnte der Bitterrezeptor TAS2R14 tatsächlich nur zur gustatorischen Wahrnehmung der Substanzen dienen oder aber als direktes extraorales Ziel fungieren, das eine pharmakologische Wirkung auslöst. Hierzu müsste der TAS2R14 in humanen extraoralen Geweben exprimiert werden, was von mehreren Arbeitsgruppen zeitgleich zu meinen Analysen untersucht worden ist. Dabei konnte eine hohe Expression im Herzen (Foster et al., 2013), in der Lungenarterie (Manson et al., 2014), in den Atemwegen (Deshpande et al., 2010; Robinett et al., 2014; Zhang et al., 2013) und im Gehirn (Ansoleaga et al., 2013) nachgewiesen werden.

Clark und Kollegen stellten die Hypothese auf, dass extraorale Bitterrezeptoren verantwortlich für Nebenwirkungen von Medikamenten sind (Clark et al., 2012). 2015 veröffentlichten sie, dass Bitterstoffe durch Aktivierung von TAS2Rs in der Schilddrüse den basalen und TSH-abhängigen Iod-Ausstrom vermindern (Clark et al., 2015). Die Zugabe von Bitterstoffen führte außerdem zu einer verringerten Produktion der Schilddrüsenhormone T3 und T4, was sich möglicherweise mit dem verminderten Iod-Ausstrom begründen lässt.

Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen Rezeptorvarianten des TAS2R42 und der Serummenge der Schilddrüsenhormone T3 und T4 hergestellt werden (TAS2R42 rs5020531: S196F → erhöhte Hormonmenge im Blutserum). Somit zeigten sie, dass die Aktivierung durch Bitterstoffe einen direkten Effekt auf physiologische Funktionen des Menschen haben kann, jedoch bestand kein Zusammenhang zwischen der Funktion der Schilddrüse und der Expression des TAS2R14.

Ansoleaga wies die Expression im menschlichen Gehirn von TAS2R4, -R5, -R10, -R13, -R14 und -R50 nach und stellte fest, dass die Expression in gesundem und krankem Gewebe unterschiedlich ist (Ansoleaga et al., 2013). Beispielsweise wird der TAS2R14 in der Großhirnrinde (zerebraler Cortex) von Parkinson-Patienten mit einer signifikant höheren Menge exprimiert. Bei Patienten mit der Creutzfeldt-Jakob (CJD)-Erkrankung zeigte sich eine erhöhte Expression von TAS2R14 im frontalen Cortex und bei der CJD Typ MM1 (homozygot für die Aminosäure Methionin an der Position 129) im Kleinhirn (Cerebellum), jedoch nicht bei dem Typ VV2 (homozygot für Valin an der Aminosäureposition 129).

Diese erhöhte Expression im erkrankten Gewebe könnte hilfreich sein, um das Gewebe durch bitter schmeckende, pharmakologisch wirkende Substanzen empfindlich zu machen. Somit könnten möglicherweise zellinterne Prozesse in Gang gebracht werden, wodurch in der Zelle Reparaturmechanismen aktiviert werden können oder die Apoptose eingeleitet werden können, um die defekte Zelle aus dem Gewebe zu entfernen. Die Einleitung der Apoptose in Krebszellen durch bitterschmeckende Substanzen, konnte beispielsweise durch Parthenolid bei akuter myeloischer Leukämie ausgelöst werden (Guzman et al., 2005). Auch der Extrakt der Bittermelone (*Momordica charantia*), einer bitterschmeckenden Frucht eines Kürbisgewächses, konnte eine inhibierende Wirkung auf die Brustkrebszellteilung nachgewiesen werden (Ray et al., 2010).

Viele Krankheiten lösen im erkrankten Organismus Entzündungsprozesse zur Bekämpfung der Krankheitsauslöser aus (Calder et al., 2009; Okin et al., 2012). Längerfristige Entzündungsprozesse schädigen jedoch das eigene Körpergewebe. Somit könnte die Hochregulation der Bitterrezeptoren im erkrankten Gewebe, durch die gekoppelte

entzündungssenkende Wirkung beim Verzehr von bitteren Pflanzeninhaltsstoffen, eine positive Wirkung auf die Wundheilung und die Heilung von Krankheiten ausgewirkt haben.

Dieser positive Effekt könnte während der Kindheit und der Zeit der Geschlechtsreife von Tieren positiv ausgewirkt haben und sich somit selektiv während der Evolution herausgebildet haben.

Die jüngst publizierten Untersuchungen wiesen die Expression aller humanen Bitterrezeptoren in Leukozyten im Blut nach und die Autoren äußerten die Vermutung, dass Bitterstoffe einen Einfluss auf das Immunsystem haben könnten (Malki et al., 2015).

In den Atemwegen unterscheidet sich die Expression des TAS2R10 und -R14 zwischen nicht-Asthmatikern und Asthmatikern (Robinett et al., 2014). Da die Inhalation von TAS2R-Agonisten zu einer Entspannung der glatten Muskulatur führt (Deshpande et al., 2010), könnte der Effekt durch eine erhöhte Expression von Bitterrezeptoren positiv verstärkt werden.

Im Herzen ist die Expression des Bitterrezeptors TAS2R14 mehr als doppelt so hoch verglichen mit anderen TAS2Rs und erreicht das Expressionsniveau vom  $\beta$ 1-Adrenergen-Rezeptor (ADRB1), welcher durch Adrenalin aktiviert wird und was die Erhöhung der Herzfrequenz zur Folge hat (Foster et al., 2013; Foster et al., 2015). Interessanterweise unterliegt die Expression des TAS2R14 im Laufe eines Lebens Schwankungen. Dabei ist sie bei jungen Erwachsenen (19 - 30 Jahre) fast dreimal so hoch, wie im Herzen von 0 - 18 jährigen Personen (Foster et al., 2015). Im Alter (50 - 65 Jahre) nimmt die Expression wieder um ein Drittel ab. Unterschiede in der Anzahl exprimierter Bitterrezeptoren zwischen Herzen von gesunden und kranken Personen konnten nicht beobachtet werden.

Seifert und Kollegen zeigten, dass es keinen Zusammenhang zwischen Bitterstoffgabe und dem Blutdruck bzw. der Herzfrequenz gibt und gingen auf Publikationen ein, welche einen Effekt durch die Einnahme von Bitterstoffen begründeten (Seifert et al., 2011). Foster und Kollegen hingegen zeigte an präparierten Mäuseherzen (C57/BL6) die Reduktion des Druckaufbaus in der linken Herzkammer und den Anstieg des Aorta-Drucks durch Gabe von Bitterstoffen (Foster et al., 2014). Dabei bleibt jedoch umstritten, ob die Reaktion, die durch die Bitterstoffe ausgelöst wird, tatsächlich durch die TAS2Rs vermittelt wird oder ob dafür andere Rezeptoren verantwortlich sind. Beispielsweise aktivieren viele TAS2R14-Agonisten auch den hERG- Kaliumkanal im menschlichen Herzen (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014).

Die benannten Veröffentlichungen lassen vermuten, dass Bitterrezeptoren in einigen extraoralen Geweben eine hohe Bedeutung haben, jedoch lässt sich pauschal keine klare Sonderstellung des TAS2R14 erkennen. Die Expressionsmenge des TAS2R14 im Herzen



lässt zwar auf eine besondere Bedeutung schließen, jedoch lässt sich dies nicht eindeutig in einen funktionellen Zusammenhang bringen. Die Frage, ob TAS2R14-Agonisten als Indikator für die Identifikation von neuen Medikamenten dienen könnte, kann nicht pauschal beantwortet werden. Da diese Substanzen oft auch andere Rezeptoren oder Kanäle aktivieren und somit die Wahrscheinlichkeit für ungewünschte Nebenwirkungen steigt.

Das Besondere am TAS2R14 ist die Aufdeckung der hohen Diversität der Agonisten (Behrens et al 2004; Levit & Nowak & Peters, et al; 2014), wobei es sich oft um Wirkstoffe handelt (Levit & Nowak & Peters, et al; 2014) und Modifikationen von Agonisten oft zu neuen Agonisten führt (unpublizierte Daten und Karaman et al., 2106). Sogar die Verknüpfung des schmerzlindernden Wirkstoffs Mefenaminsäure mit dem gerinnungsfördernden Wirkstoff Tranexamin führt zu einer chemischen Verbindung, die immer noch den TAS2R14 aktiviert, wenn auch mit wesentlich geringerer Effizienz.

Die Charakterisierung der Bindungstasche mit ihren wichtigen, interagierenden (**T86**<sup>3.29</sup>, **W89**<sup>3.32</sup>, **T90**<sup>3.33</sup>, **N93**<sup>3.36</sup>, **F186**<sup>5.46</sup>, **F243**<sup>6.51</sup>, **F247**<sup>6.55</sup> und **Q266**<sup>7.39</sup>) und stabilisierenden Aminosäuren (**W66**<sup>2.61</sup> und **Y240**<sup>6.48</sup>) sowie die Identifikation der großen Bandbreite von strukturellen Eigenschaften kann in Zukunft die Vorhersage von Agonisten und Antagonisten unterstützen. Dabei gelang es Parallelen zu anderen Bitterrezeptoren zu ziehen. Somit ist beispielsweise die Position 3.29 auch beim TAS2R10 (Born et al., 2013) und die Position 7.39 beim TAS2R46 (Brockhoff et al., 2007) bedeutend für die Interaktion mit den Agonisten.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Eigenschaften des TAS2R14 und seinen Agonisten können in Zukunft möglicherweise hilfreich bei der Wirkstoffidentifikation sein. Dazu müsste jedoch der Zusammenhang der TAS2Rs und Wirkstoffe weiter untersucht werden. Zusätzlich müssten mehr Erkenntnisse über weitere Rezeptoren bzw. Kanäle gesammelt werden, damit diese nicht ungewollt Aktivierung werden und somit Nebenwirkungen hervorrufen.

Des Weiteren können die Erkenntnisse möglicherweise bei der Entwicklung von Bitterblockern genutzt werden, um die Wirkstofftoleranz beispielsweise bei Kindern zu erhöhen. Somit könnten Medikamente für Kinder ohne große Mengen an Zucker oder Zuckerersatzstoffe hergestellt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit konnte die Lage der Bindungstasche zeigen und identifizierte Aminosäurepositionen, welche mit den Agonisten interagieren. Des Weiteren wurde die Bedeutung der extrazellulären Schleifen untersucht, wodurch die Rolle der ECLs für die Zugangskontrolle der TAS2R14-Agonisten aufgedeckt werden konnte.

Nachdem der TAS2R14 als Generalist identifiziert worden ist (Meyerhof et al., 2010) stellte sich die Frage: Wie ist es möglich, dass so viele chemisch unterschiedliche Agonisten diesen Rezeptor aktivieren? Die Annahme, dass das große Agonistenspektrum durch eine hohe Flexibilität in der Bindungstasche begründet wird, konnte widerlegt werden. Die Seitenketten der Aminosäuren in der Bindungstasche können nicht agonistenspezifisch durch Torsion aus der Bindungstasche entfernt werden und somit Platz für bessere Interaktion einzelner Substanzen schaffen. Die funktionellen Analysen identifizierten agonistenspezifisch Interaktion innerhalb der Bindungstasche.

Aus den Untersuchungen der Agonisten-Derivaten konnte geschlossen werden, dass die Bindungstasche sehr geräumig ist, da die Aktivierbarkeit des TAS2R14 trotz großer zusätzlicher Anhänge erhalten bleibt mit vielfältigen Möglichkeiten der Interaktion über diverse Interaktionsarten. Der Vergleich der finalen Docking-Modelle lagen die sieben untersuchten Agonisten (Aristolochiasäure, Flufenaminsäure, Pikrotoxinin, Santonin, Parthenolid, Thujon und Genistein) immer zwischen den gleichen Aminosäuren in der Bindungstasche. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ausrichtung der Agonisten in der Bindungstasche nicht immer gleich ist, auch wenn die Substanzen zu einer gemeinsamen chemischen Klasse angehören.

Der große Unterschied zu den anderen TAS2Rs liegt in der hohen Aktivierungsstabilität gegenüber Punktmutationen.

Da der TAS2R14 von so vielen Substanzen oft mit pharmakologischer Wirkung aktiviert werden kann, kann das erworbene Wissen mit den entstandenen Pharmakophormodellen zur Vorhersage von Bitterblocker, off-target Wirkungen oder Prodrogen genutzt werden.

## 6. Summary

After the TAS2R14 has been identified as a generalist (Meyerhof et al., 2010) the question arose: How is it possible that so many chemically different agonists activate this receptor? This thesis provides evidence on the location of the TAS2R14 binding pocket and identifies amino acid positions, which interact with the various agonists. Furthermore, the importance of extracellular loops for the receptor's agonist access control was investigated.

The assumption that the broad agonist spectrum is based on high structural flexibility in the binding pocket was not confirmed. The side chains of the amino acids in the binding pocket are rather immobile and not able to move in and out of the pocket depending on the contact points required by the individual agonists.

The functional analysis identified agonist-specific interaction within the binding pocket.

The study of agonist derivatives with large chemical groups attached to agonist cores revealed that the majority of the modified molecules can still activate the TAS2R14 receptor. Therefore, it can be concluded that the binding pocket is very spacious allowing multiple possibilities for interactions by various kinds of ligands.

Comparison of homology models with docked agonists shows that all seven examined agonists (aristolochic acid, flufenamic acid, picrotoxinin, santonin, parthenolide, thujone and genistein) occupy a common shared binding pocket. However, even if agonists belong to the same chemical class, their orientation within the binding pocket can be different.

The high resilience of TAS2R14 activation upon the insertion of point mutations represented a striking difference compared to other previously investigated TAS2Rs. Furthermore, as the TAS2R14 can be activated by a considerable number of agonists with profound pharmacological effects, the acquired knowledge from pharmacophore models created during this thesis can be helpful to predict bitter blockers, off-target effects or prodrugs.

## 7. Literaturverzeichnis

- Adekenov, S., Mukhametzhanov, M., Kagarlitskii, A., & Kupriyanov, A. (1982). Argabin— A new sesquiterpene lactone from *Artemisia glabella*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(5), 623-624.
- 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(6), 693-702.
- Almaula, N., Ebersole, B. J., Zhang, D., Weinstein, H., & Sealfon, S. C. (1996). Mapping the binding site pocket of the serotonin 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> receptor. Ser3.36(159) provides a second interaction site for the protonated amine of serotonin but not of lysergic acid diethylamide or bufotenin. *J Biol Chem*, 271(25), 14672-14675.
- Althaus, F. R. (2007). *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: 131 Tabellen*: Georg Thieme Verlag.
- Amin, A., & Buratovich, M. (2007). The anti-cancer charm of flavonoids: a cup-of-tea will do! *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2(2), 109-117.
- Amrein, H., & Thorne, N. (2005). Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*, 15(17), R673-684. doi: 10.1016/j.cub.2005.08.021
- Anderson, G. H. (1995). Sugars, sweetness, and food intake. *Am J Clin Nutr*, 62(1 Suppl), 195S-201S; discussion 201S-202S.
- Ando, M., Akahane, A., Yamaoka, H., & Takase, K. (1982). Syntheses of arborescin, 1, 10-epiarborescin, and (11S)-guaia-3, 10 (14)-dieno-13, 6. alpha.-lactone, the key intermediate in Greene and Crabbe's estafiatin synthesis, and the stereochemical assignment of arborescin. *The Journal of Organic Chemistry*, 47(20), 3909-3916.
- Ansoleaga, B., Garcia-Esparcia, P., Llorens, F., Moreno, J., Aso, E., & Ferrer, I. (2013). Dysregulation of brain olfactory and taste receptors in AD, PSP and CJD, and AD-related model. *Neuroscience*, 248, 369-382. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.06.034
- Appendino, G., Borrelli, F., Capasso, R., Campagnuolo, C., Fattorusso, E., Petrucci, F., & Tagliatalata-Scafati, O. (2003). Minor diterpenoids from cascarilla (*Croton eluteria* Bennet) and evaluation of the cascarilla extract and cascarillin effects on gastric acid secretion. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(24), 6970-6974.
- Armstrong, N., & Gouaux, E. (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*, 28(1), 165-181.
- Ashihara, H., Monteiro, A. M., Gillies, F. M., & Crozier, A. (1996). Biosynthesis of Caffeine in Leaves of Coffee. *Plant Physiol*, 111(3), 747-753.
- Ashmore, J. F., & Falk, G. (1981). Photon-like signals following weak rhodopsin bleaches. *Nature*, 289(5797), 489-491.
- Avenet, P., & Lindemann, B. (1988). Amiloride-blockable sodium currents in isolated taste receptor cells. *J Membr Biol*, 105(3), 245-255.
- Baddar, N. W., Aburjai, T. A., Taha, M. O., & Disi, A. M. (2011). Thujone corrects cholesterol and triglyceride profiles in diabetic rat model. *Nat Prod Res*, 25(12), 1180-1184. doi: 10.1080/14786419.2010.496116
- Baker, E. N., & Hubbard, R. E. (1984). Hydrogen bonding in globular proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 44(2), 97-179.
- Baldwin, R. L. (1995). The nature of protein folding pathways: the classical versus the new view. *J Biomol NMR*, 5(2), 103-109.

- Ballesteros, J. A., & Weinstein, H. (1995). Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in neurosciences*, 25, 366 - 428.
- 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), 1-12. doi: 10.1002/cne.20954
- Beauchamp, G. K., Bertino, M., Burke, D., & Engelman, K. (1990). Experimental sodium depletion and salt taste in normal human volunteers. *Am J Clin Nutr*, 51(5), 881-889.
- Beck, A., Krischak, G., Sorg, T., Augat, P., Farker, K., Merkel, U., . . . Claes, L. (2003). Influence of diclofenac (group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs) on fracture healing. *Arch Orthop Trauma Surg*, 123(7), 327-332. doi: 10.1007/s00402-003-0537-5
- 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(2), 479-485.
- 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. *J Neurosci*, 27(46), 12630-12640.
- 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(12), 3216-3227. doi: 10.1093/molbev/msu254
- Behrens, M., Reichling, C., Batram, C., Brockhoff, A., & Meyerhof, W. (2009). Bitter taste receptors and their cells. *Ann NY Acad Sci*, 1170, 111-115.
- Belecky, T. L., & Smith, D. V. (1990). Postnatal development of palatal and laryngeal taste buds in the hamster. *J Comp Neurol*, 293(4), 646-654. doi: 10.1002/cne.902930409
- Belitz, H. D., & Wieser, H. (1985). Bitter compounds: occurrence and structure activity relationship. *Food Rev Int.*, 1, 271-354.
- Biarnes, X., Marchiori, A., Giorgetti, A., Lanzara, C., Gasparini, P., Carloni, P., . . . Meyerhof, W. (2010). Insights into the binding of Phenylthiocarbamide (PTC) agonist to its target human TAS2R38 bitter receptor. *PLoS One*, 5(8), e12394. doi: 10.1371/journal.pone.0012394
- Birladeanu, L. (2003). The stories of santonin and santonic acid. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(11), 1202-1208.
- 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(1), 201-213. doi: 10.1523/jneurosci.3248-12.2013
- Brandl, M., Weiss, M. S., Jabs, A., Suhnel, J., & Hilgenfeld, R. (2001). C-H...pi-interactions in proteins. *J Mol Biol*, 307(1), 357-377. doi: 10.1006/jmbi.2000.4473
- Breslin, P. A., & Huang, L. (2006). Human taste: peripheral anatomy, taste transduction, and coding. *Adv Otorhinolaryngol*, 63, 152-190.
- Brockhoff, A. (2009). *Struktur-Funktionsbeziehungen menschlicher Bitterrezeptoren*.
- 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(15), 6236-6243.
- 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(24), 11110-11115.
- Brown, J. H., & Pollock, S. H. (1970). Inhibition of elastase and collagenase by anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*, 135(3), 792-795.
- Bufe, B., Breslin, P. A., Kuhn, C., Reed, D. R., Tharp, C. D., Slack, J. P., . . . Meyerhof, W. (2005). The molecular basis of individual differences in phenylthiocarbamide and

- propylthiouracil bitterness perception. *Curr Biol*, 15(4), 322-327. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.047
- 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(3), 397-401. doi: 10.1038/ng1014
- Bushman, J. D., Ye, W., & Liman, E. R. (2015). A proton current associated with sour taste: distribution and functional properties. *FASEB J*, 29(7), 3014-3026. doi: 10.1096/fj.14-265694
- Caicedo, A., Kim, K. N., & Roper, S. D. (2002). Individual mouse taste cells respond to multiple chemical stimuli. *J Physiol*, 544(Pt 2), 501-509.
- Calder, P. C., Albers, R., Antoine, J. M., Blum, S., Bourdet-Sicard, R., Ferns, G. A., . . . Zhao, J. (2009). Inflammatory disease processes and interactions with nutrition. *Br J Nutr*, 101 Suppl 1, S1-45. doi: 10.1017/s0007114509377867
- Carlsson, J., Coleman, R. G., Setola, V., Irwin, J. J., Fan, H., Schlessinger, A., . . . Shoichet, B. K. (2011). Ligand discovery from a dopamine D3 receptor homology model and crystal structure. *Nat Chem Biol*, 7(11), 769-778. doi: 10.1038/nchembio.662
- Cavanagh, J. (1996). *Protein NMR Spectroscopy: Principles & Practice*.
- Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*, 444(7117), 288-294.
- 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(7286), 297-301. doi: 10.1038/nature08783
- Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., . . . Ryba, N. J. (2000). T2Rs function as bitter taste receptors. *Cell*, 100(6), 703-711.
- Chang, R. B., Waters, H., & Liman, E. R. (2010). A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(51), 22320-22325. doi: 10.1073/pnas.1013664107
- Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *J Cell Biol*, 190(3), 285-296. doi: 10.1083/jcb.201003144
- Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., . . . Stevens, R. C. (2007). High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 318(5854), 1258-1265. doi: 10.1126/science.1150577
- Chien, E. Y., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G. W., Hanson, M. A., . . . Stevens, R. C. (2010). Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist. *Science*, 330(6007), 1091-1095. doi: 10.1126/science.1197410
- Clark, A. A., Dotson, C. D., Elson, A. E., Voigt, A., Boehm, U., Meyerhof, W., . . . Munger, S. D. (2015). TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function. *FASEB J*, 29(1), 164-172. doi: 10.1096/fj.14-262246
- Clark, A. A., Liggett, S. B., & Munger, S. D. (2012). Extraoral bitter taste receptors as mediators of off-target drug effects. *FASEB J*, 26(12), 4827-4831. doi: 10.1096/fj.12-215087
- Cook, S. J., Palmer, S., Plevin, R., & Wakelam, M. J. (1990). Mass measurement of inositol 1,4,5-trisphosphate and sn-1,2-diacylglycerol in bombesin-stimulated Swiss 3T3 mouse fibroblasts. *Biochem J*, 265(2), 617-620.
- Dai, W., You, Z., Zhou, H., Zhang, J., & Hu, Y. (2011). Structure-function relationships of the human bitter taste receptor hTAS2R1: insights from molecular modeling studies. *J Recept Signal Transduct Res*, 31(3), 229-240.
- Davis, D., Liu, X., & Segaloff, D. L. (1995). Identification of the sites of N-linked glycosylation on the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor and assessment of their role in FSH receptor function. *Mol Endocrinol*, 9(2), 159-170. doi: 10.1210/mend.9.2.7776966

- Davis, I. W., Arendall, W. B., 3rd, Richardson, D. C., & Richardson, J. S. (2006). The backrub motion: how protein backbone shrugs when a sidechain dances. *Structure*, *14*(2), 265-274. doi: 10.1016/j.str.2005.10.007
- Deckmann, K., Filipinski, K., Krasteva-Christ, G., Fronius, M., Althaus, M., Rafiq, A., . . . Kummer, W. (2014). Bitter triggers acetylcholine release from polymodal urethral chemosensory cells and bladder reflexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(22), 8287-8292. doi: 10.1073/pnas.1402436111
- 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*(15), 3971-3980. doi: 10.1523/jneurosci.0515-06.2006
- Deshpande, D. A., Wang, W. C., McIlmoyle, E. L., Robinett, K. S., Schillinger, R. M., An, S. S., . . . Liggett, S. B. (2010). Bitter taste receptors on airway smooth muscle bronchodilate by localized calcium signaling and reverse obstruction. *Nat Med*, *16*(11), 1299-1304. doi: 10.1038/nm.2237
- Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, *51*(1), 7-61.
- Dixon, R. A., Kobilka, B. K., Strader, D. J., Benovic, J. L., Dohlman, H. G., Frielle, T., . . . Strader, C. D. (1986). Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, *321*(6065), 75-79. doi: 10.1038/321075a0
- Dornblüth, O. (1927). *Klinisches Wörterbuch*.
- Dotson, C. D. (2010). The search for mechanisms underlying the sour taste evoked by acids continues. *Chem Senses*, *35*(7), 545-547. doi: 10.1093/chemse/bjq044
- Dotson, C. D., Wallace, M. R., Bartoshuk, L. M., & Logan, H. L. (2012). Variation in the gene TAS2R13 is associated with differences in alcohol consumption in patients with head and neck cancer. *Chem Senses*, *37*(8), 737-744. doi: 10.1093/chemse/bjs063
- Dotson, C. D., Zhang, L., Xu, H., Shin, Y. K., Vignes, S., Ott, S. H., . . . Munger, S. D. (2008). Bitter taste receptors influence glucose homeostasis. *PLoS One*, *3*(12), e3974. doi: 10.1371/journal.pone.0003974
- Dougherty, D. A. (1996). Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, *271*(5246), 163-168.
- Duffy, V. B., Davidson, A. C., Kidd, J. R., Kidd, K. K., Speed, W. C., Pakstis, A. J., . . . Bartoshuk, L. M. (2004). Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-n-propylthiouracil (PROP) bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res*, *28*(11), 1629-1637.
- Eddy, M. C., Eschle, B. K., Barrows, J., Hallock, R. M., Finger, T. E., & Delay, E. R. (2009). Double P2X2/P2X3 purinergic receptor knockout mice do not taste NaCl or the artificial sweetener SC45647. *Chem Senses*, *34*(9), 789-797. doi: 10.1093/chemse/bjp068
- Erb, L., Garrad, R., Wang, Y., Quinn, T., Turner, J. T., & Weisman, G. A. (1995). Site-directed mutagenesis of P2U purinoceptors. Positively charged amino acids in transmembrane helices 6 and 7 affect agonist potency and specificity. *J Biol Chem*, *270*(9), 4185-4188.
- Fang, G., Weiser, B., Visosky, A., Moran, T., & Burger, H. (1999). PCR-mediated recombination: a general method applied to construct chimeric infectious molecular clones of plasma-derived HIV-1 RNA. *Nat Med*, *5*(2), 239-242. doi: 10.1038/5607
- Farbman. (1965). Fine structure of the taste bud. *J. ULTRASTRUCTURE RESEARCH*, *12*, 328-350.
- Feng, P., Zheng, J., Rossiter, S. J., Wang, D., & Zhao, H. (2014). Massive losses of taste receptor genes in toothed and baleen whales. *Genome Biol Evol*, *6*(6), 1254-1265. doi: 10.1093/gbe/evu095

- 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*(15), 8981-8986. doi: 10.1073/pnas.1531172100
- Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L., Vigers, A. J., Stone, L., . . . Kinnamon, S. C. (2005). ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science*, *310*(5753), 1495-1499. doi: 10.1126/science.1118435
- Fisher, R. A., E. B. Ford and J. Huxley. (1939). Taste-testing the anthropoid apes. *Nature*, *144*, 750.
- Foster, S. R., Blank, K., See Hoe, L. E., Behrens, M., Meyerhof, W., Peart, J. N., & Thomas, W. G. (2014). Bitter taste receptor agonists elicit G-protein-dependent negative inotropy in the murine heart. *FASEB J*. doi: 10.1096/fj.14-256305
- Foster, S. R., Porrello, E. R., Purdue, B., Chan, H. W., Voigt, A., Frenzel, S., . . . Thomas, W. G. (2013). Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS One*, *8*(5), e64579. doi: 10.1371/journal.pone.0064579
- Foster, S. R., Porrello, E. R., Stefani, M., Smith, N. J., Molenaar, P., dos Remedios, C. G., . . . Ramialison, M. (2015). Cardiac gene expression data and in silico analysis provide novel insights into human and mouse taste receptor gene regulation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *388*(10), 1009-1027. doi: 10.1007/s00210-015-1118-1
- Fox, A. L. (1932). The Relationship between Chemical Constitution and Taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *18*(1), 115-120.
- Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G., & Schiöth, 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*(6), 1256-1272. doi: 10.1124/mol.63.6.1256
- Fujikura, K. (2015). Multiple loss-of-function variants of taste receptors in modern humans. *Sci Rep*, *5*, 12349. doi: 10.1038/srep12349
- 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*(2), 97-106. doi: 10.1054/ceca.1999.0095
- Giese, M. R. A. (2011). *Relevanz und Nutzung von Anionen- $\pi$  Wechselwirkungen*. RWTH Aachen Universität.
- Glendinning, J. I. (1994). Is the bitter rejection response always adaptive? *Physiol Behav*, *56*(6), 1217-1227.
- Glick, I. D., Lemmens, P., & Vester-Blokland, E. (2001). Treatment of the symptoms of schizophrenia: a combined analysis of double-blind studies comparing risperidone with haloperidol and other antipsychotic agents. *Int Clin Psychopharmacol*, *16*(5), 265-274.
- Gotz, R. J., Robertazzi, A., Mutikainen, I., Turpeinen, U., Gamez, P., & Reedijk, J. (2008). Concurrent anion...pi interactions between a perchlorate ion and two pi-acidic aromatic rings, namely pentafluorophenol and 1,3,5-triazine. *Chem Commun (Camb)*(29), 3384-3386. doi: 10.1039/b803817a
- Guan, X. M., Peroutka, S. J., & Kobilka, B. K. (1992). Identification of a single amino acid residue responsible for the binding of a class of beta-adrenergic receptor antagonists to 5-hydroxytryptamine1A receptors. *Mol Pharmacol*, *41*(4), 695-698.
- Guth, L. (1957). The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat Rec*, *128*(4), 715-731.
- Guzman, M. L., Rossi, R. M., Karnischky, L., Li, X., Peterson, D. R., Howard, D. S., & Jordan, C. T. (2005). The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells. *Blood*, *105*(11), 4163-4169. doi: 10.1182/blood-2004-10-4135



- Haga, K., Kruse, A. C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., . . . Kobayashi, T. (2012). Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature*, *482*(7386), 547-551. doi: 10.1038/nature10753
- Hamilton, R. B., & Norgren, R. (1984). Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol*, *222*(4), 560-577. doi: 10.1002/cne.902220408
- Hanamori, T., Miller, I. J., Jr., & Smith, D. V. (1988). Gustatory responsiveness of fibers in the hamster glossopharyngeal nerve. *J Neurophysiol*, *60*(2), 478-498.
- Hankins, W. G., Rusiniak, K. W., & Garcia, J. (1976). Dissociation of odor and taste in shock-avoidance learning. *Behav Biol*, *18*(3), 345-358.
- Hanson, M. A., Roth, C. B., Jo, E., Griffith, M. T., Scott, F. L., Reinhart, G., . . . Stevens, R. C. (2012). Crystal structure of a lipid G protein-coupled receptor. *Science*, *335*(6070), 851-855. doi: 10.1126/science.1215904
- Hayakawa, T., Sugawara, T., Go, Y., Uono, T., Hirai, H., & Imai, H. (2012). Ecogeographical diversification of bitter taste receptor genes (TAS2Rs) among subspecies of chimpanzees (*Pan troglodytes*). *PLoS One*, *7*(8), e43277. doi: 10.1371/journal.pone.0043277
- Hayes, J. E., Wallace, M. R., Knopik, V. S., Herbstman, D. M., Bartoshuk, L. M., & Duffy, V. B. (2011). 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*(3), 311-319. doi: 10.1093/chemse/bjq132
- Heck, G. L., Mierson, S., & DeSimone, J. A. (1984). Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science*, *223*(4634), 403-405.
- Hell, S. W., & Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, *19*(11), 780-782.
- Herdegen, T. (2013). *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*: Georg Thieme Verlag.
- Hilliard, M. A., Bergamasco, C., Arbucci, S., Plasterk, R. H., & Bazzicalupo, P. (2004). Worms taste bitter: ASH neurons, QUI-1, GPA-3 and ODR-3 mediate quinine avoidance in *Caenorhabditis elegans*. *Embo j*, *23*(5), 1101-1111. doi: 10.1038/sj.emboj.7600107
- Hoek, W. Z. (1997). "Late-glacial and early Holocene climatic events and chronology of vegetation development in the Netherlands." *Vegetation History and Archaeobotany* *6* (4), 197-213.
- Hold, K. M., Sirisoma, N. S., Ikeda, T., Narahashi, T., & Casida, J. E. (2000). Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(8), 3826-3831. doi: 10.1073/pnas.070042397
- Holm, S.R., & Svenning, J.C. (2014). "180,000 years of climate change in Europe: avifaunal responses and vegetation implications." *PloS one* *9* (4), e94021.
- Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (1999). Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity. *Cell*, *96*(4), 541-551.
- Horio, N., Yoshida, R., Yasumatsu, K., Yanagawa, Y., Ishimaru, Y., Matsunami, H., & Ninomiya, Y. (2011). Sour taste responses in mice lacking PKD channels. *PLoS One*, *6*(5), e20007. doi: 10.1371/journal.pone.0020007
- Hoseini, S. S., & Sauer, M. G. (2015). Molecular cloning using polymerase chain reaction, an educational guide for cellular engineering. *J Biol Eng*, *9*, 2. doi: 10.1186/1754-1611-9-2
- Hoyer, D., & Boddeke, H. W. (1993). Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol Sci*, *14*(7), 270-275.

- Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Guo, W., Trankner, D., . . . Zuker, C. S. (2006). The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature*, 442(7105), 934-938. doi: 10.1038/nature05084
- Huang, L., Shanker, Y. G., Dubauskaite, J., Zheng, J. Z., Yan, W., Rosenzweig, S., . . . Margolskee, R. F. (1999). Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP3 responses to bitter denatonium. *Nat Neurosci*, 2(12), 1055-1062.
- 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(Pt 12), 2903-2912. doi: 10.1113/jphysiol.2008.151233
- Huang, Y. J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., & Roper, S. D. (2007). The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(15), 6436-6441. doi: 10.1073/pnas.0611280104
- Huber, R. G., Margreiter, M. A., Fuchs, J. E., von Grafenstein, S., Tautermann, C. S., Liedl, K. R., & Fox, T. (2014). Heteroaromatic pi-stacking energy landscapes. *J Chem Inf Model*, 54(5), 1371-1379. doi: 10.1021/ci500183u
- Hunter, C. A., Low, C. M., Rotger, C., Vinter, J. G., & Zonta, C. (2002). Substituent effects on cation-pi interactions: a quantitative study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 4873-4876. doi: 10.1073/pnas.072647899
- Intelmann, D., Kummerlowe, G., Haseleu, G., Desmer, N., Schulze, K., Frohlich, R., . . . Hofmann, T. (2009). Structures of storage-induced transformation products of the beer's bitter principles, revealed by sophisticated NMR spectroscopic and LC-MS techniques. *Chemistry*, 15(47), 13047-13058. doi: 10.1002/chem.200902058
- James, L. C., & Tawfik, D. S. (2003). Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci*, 28(7), 361-368. doi: 10.1016/s0968-0004(03)00135-x
- Jastorff, B., Störmann, R., & Wölcke, U. (2003). *Struktur - Wirkungs - Denken in der Chemie -eine Chance für mehr Nachhaltigkeit.*
- Jeon, T. I., Zhu, B., Larson, J. L., & Osborne, T. F. (2008). SREBP-2 regulates gut peptide secretion through intestinal bitter taste receptor signaling in mice. *J Clin Invest*, 118(11), 3693-3700.
- Jiang, L., & Lai, L. (2002). CH...O hydrogen bonds at protein-protein interfaces. *J Biol Chem*, 277(40), 37732-37740. doi: 10.1074/jbc.M204514200
- Jiang, P., Josue, J., Li, X., Glaser, D., Li, W., Brand, J. G., . . . Beauchamp, G. K. (2012). Major taste loss in carnivorous mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(13), 4956-4961. doi: 10.1073/pnas.1118360109
- Jiang, Q., Guo, D., Lee, B. X., Van Rhee, A. M., Kim, Y. C., Nicholas, R. A., . . . Jacobson, K. A. (1997). A mutational analysis of residues essential for ligand recognition at the human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol*, 52(3), 499-507.
- Kahler, M. (1830). *Archiv der Pharmazie: Weinheim, Germany.*
- Kang, M., Hong, D., Kim, T., Chu, M., & Kim, S. W. (2013). Confocal laser scanning microscopy measurement of the morphology of vanadium pentoxide nanorods grown by electron beam irradiation or thermal oxidation. *Journal of Nanophotonics*, 7(1), 073797-073797.
- Kaplick, M. (1953). [The occurrence, distribution and histological relations of taste buds in the roof of the mouth of several mammals, especially rodents]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 38(6), 571-590.
- Karaman, R., Nowak, S., Di Pizio, A., Kitaneh, H., Abu-Jaish, A., Meyerhof, W., . . . Behrens, M. (2016). Probing the binding pocket of the broadly tuned human bitter taste receptor TAS2R14 by chemical modification of cognate agonists. *Chem Biol Drug Des*. doi: 10.1111/cbdd.12734

- Kay, L. E. (2005). NMR studies of protein structure and dynamics. *J Magn Reson*, 173(2), 193-207. doi: 10.1016/j.jmr.2004.11.021
- Kim, U., Wooding, S., Ricci, D., Jorde, L. B., & Drayna, D. (2005). Worldwide haplotype diversity and coding sequence variation at human bitter taste receptor loci. *Hum Mutat*, 26(3), 199-204. doi: 10.1002/humu.20203
- Kim, U. K., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N., & Drayna, D. (2003). Positional cloning of the human quantitative trait locus underlying taste sensitivity to phenylthiocarbamide. *Science*, 299(5610), 1221-1225. doi: 10.1126/science.1080190
- Kinnamon, S. C., & Margolskee, R. F. (1996). Mechanisms of taste transduction. *Curr Opin Neurobiol*, 6(4), 506-513.
- Kneussel, M., Hermann, A., Kirsch, J., & Betz, H. (1999). Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin. *J Neurochem*, 72(3), 1323-1326.
- Kochergin, P. M., & Shmidt, I. S. (1965). [The synthesis of azathioprine]. *Med Prom SSSR*, 19(8), 6-8.
- Kopin, A. S., McBride, E. W., Quinn, S. M., Kolakowski, L. F., Jr., & Beinborn, M. (1995). The role of the cholecystokinin-B/gastrin receptor transmembrane domains in determining affinity for subtype-selective ligands. *J Biol Chem*, 270(10), 5019-5023.
- Kruse, A. C., Hu, J., Pan, A. C., Arlow, D. H., Rosenbaum, D. M., Rosemond, E., . . . Kobilka, B. K. (2012). Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 482(7386), 552-556. doi: 10.1038/nature10867
- Kryger, G., Silman, I., & Sussman, J. L. (1999). Structure of acetylcholinesterase complexed with E2020 (Aricept): implications for the design of new anti-Alzheimer drugs. *Structure*, 7(3), 297-307.
- Kuhn, C., Bufe, B., Winnig, M., Hofmann, T., Frank, O., Behrens, M., . . . Meyerhof, W. (2004). Bitter taste receptors for saccharin and acesulfame K. *J Neurosci*, 24(45), 10260-10265. doi: 10.1523/jneurosci.1225-04.2004
- Kuipers, W., Link, R., Standaar, P. J., Stoit, A. R., Van Wijngaarden, I., Leurs, R., & Ijzerman, A. P. (1997). Study of the interaction between aryloxypropanolamines and Asn386 in helix VII of the human 5-hydroxytryptamine1A receptor. *Mol Pharmacol*, 51(5), 889-896.
- Lalonde, E. R., & Eglitis, J. A. (1961). Number and distribution of taste buds on the epiglottis, pharynx, larynx, soft palate and uvula in a human newborn. *Anat Rec*, 140, 91-95.
- 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(9), 3163-3171.
- Le Neve, B., Foltz, M., Daniel, H., & Gouka, R. (2010). The steroid glycoside H.g.-12 from *Hoodia gordonii* activates the human bitter receptor TAS2R14 and induces CCK release from HuTu-80 cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 299(6), G1368-1375. doi: 10.1152/ajpgi.00135.2010
- Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G., & Tate, C. G. (2011). Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. *Nature*, 474(7352), 521-525. doi: 10.1038/nature10136
- Lednicer, D. (2007). *The organic chemistry of drug synthesis* (Vol. 7): John Wiley & Sons.
- Lee, J. Y., & Lyman, E. (2012). Agonist dynamics and conformational selection during microsecond simulations of the A(2A) adenosine receptor. *Biophys J*, 102(9), 2114-2120. doi: 10.1016/j.bpj.2012.03.061
- 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*. doi: 10.1096/fj.13-242594

- Li, D., & Zhang, J. (2014). Diet shapes the evolution of the vertebrate bitter taste receptor gene repertoire. *Mol Biol Evol*, *31*(2), 303-309. doi: 10.1093/molbev/mst219
- Li, X., Li, W., Wang, H., Cao, J., Maehashi, K., Huang, L., . . . Brand, J. G. (2005). Pseudogenization of a sweet-receptor gene accounts for cats' indifference toward sugar. *PLoS Genet*, *1*(1), 27-35. doi: 10.1371/journal.pgen.0010003
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(7), 4692-4696. doi: 10.1073/pnas.072090199
- Liapakis, G., Ballesteros, J. A., Papachristou, S., Chan, W. C., Chen, X., & Javitch, J. A. (2000). The forgotten serine. A critical role for Ser-2035.42 in ligand binding to and activation of the beta 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, *275*(48), 37779-37788. doi: 10.1074/jbc.M002092200
- Lindemann, B. (1996). Chemoreception: tasting the sweet and the bitter. *Curr Biol*, *6*(10), 1234-1237.
- Lindemann, B. (2001). Receptors and transduction in taste. *Nature*, *413*(6852), 219-225. doi: 10.1038/35093032
- Litosch, I. (2002). Novel mechanisms for feedback regulation of phospholipase C-beta activity. *IUBMB Life*, *54*(5), 253-260. doi: 10.1080/15216540215673
- Liu, D., & Liman, E. R. (2003). Intracellular Ca<sup>2+</sup> and the phospholipid PIP<sub>2</sub> regulate the taste transduction ion channel TRPM5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(25), 15160-15165. doi: 10.1073/pnas.2334159100
- Ljungh, A., Yanagisawa, N., & Wadstrom, T. (2006). Using the principle of hydrophobic interaction to bind and remove wound bacteria. *J Wound Care*, *15*(4), 175-180. doi: 10.12968/jowc.2006.15.4.26901
- Lossow (2011). *Erzeugung und Charakterisierung von Mausmodellen mit lichtsensitivem Geschmackssystem zur Aufklärung der neuronalen Geschmackskodierung*.
- Loven. (1868). Beiträge zur Kenntnis vom Bau der Geschmackswärzchen der Zunge. *Mikrok Anat*, *4*, 98 - 110.
- Maehashi, K., Matano, M., Wang, H., Vo, L. A., Yamamoto, Y., & Huang, L. (2008). Bitter peptides activate hTAS2Rs, the human bitter receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, *365*(4), 851-855. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.070
- 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*. doi: 10.1189/jlb.2A0714-331RR
- Manson, M. L., Säfholm, J., Al-Ameri, M., Bergman, P., Orre, A.-C., Swärd, K., . . . Adner, M. (2014). Bitter taste receptor agonists mediate relaxation of human and rodent vascular smooth muscle. *European journal of pharmacology*, *740*, 302-311.
- Marchiori, A., Capece, L., Giorgetti, A., Gasparini, P., Behrens, M., Carloni, P., & Meyerhof, W. (2013). Coarse-Grained/Molecular Mechanics of the TAS2R38 Bitter Taste Receptor: Experimentally-Validated Detailed Structural Prediction of Agonist Binding. *PLoS One*, *8*(5), e64675. doi: 10.1371/journal.pone.0064675
- Margolskee, R. F. (1993). The molecular biology of taste transduction. *BioEssays*, *15*(10), 645.
- Matsunami, H., Montmayeur, J. P., & Buck, L. B. (2000). A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature*, *404*(6778), 601-604. doi: 10.1038/35007072
- McNaught, A. D., & Wilkinson, A. (1997). Compendium of chemical terminology. IUPAC recommendations.
- Meyer. (2003). *Wechselwirkungen mit aromatischen Ringen in chemischen und biologischen Erkennungsprozessen*.
- Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A., Chudoba, E., Bufe, B., . . . Behrens, M. (2010). The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chem Senses*, *35*(2), 157-170.

- Meyerhof, W., Behrens, M., Brockhoff, A., Bufe, B., & Kuhn, C. (2005a). Human bitter taste perception. *Chem Senses*, *30 Suppl 1*, i14-15. doi: 10.1093/chemse/bjh089
- Meyerhof, W. (2005b). Elucidation of mammalian bitter taste. In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, 37-72.
- Miller, I. J., & Spangler, K. M. (1982). Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat. *Chem Senses*, *7*(1), 99-108.
- Mishra, K., Chakraborty, D., Pal, A., & Dey, N. (2010). Plasmodium falciparum: in vitro interaction of quassin and neo-quassin with artesunate, a hemisuccinate derivative of artemisinin. *Experimental parasitology*, *124*(4), 421-427.
- Moll, R., Derry, S., Moore, R. A., & McQuay, H. J. (2011). Single dose oral mefenamic acid for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*(3), Cd007553. doi: 10.1002/14651858.CD007553.pub2
- Mülhardt, C. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics* (Vol. 2): Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag.
- Murakami, M., & Kouyama, T. (2008). Crystal structure of squid rhodopsin. *Nature*, *453*(7193), 363-367. doi: 10.1038/nature06925
- Murata, Y., Yasuo, T., Yoshida, R., Obata, K., Yanagawa, Y., Margolskee, R. F., & Ninomiya, Y. (2010). Action potential-enhanced ATP release from taste cells through hemichannels. *J Neurophysiol*, *104*(2), 896-901. doi: 10.1152/jn.00414.2010
- Murray, R. G. (1986). The mammalian taste bud type III cell: a critical analysis. *J Ultrastruct Mol Struct Res*, *95*(1-3), 175-188.
- 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*(6877), 199-202. doi: 10.1038/nature726
- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, *106*(3), 381-390.
- Nelson, T. M., Lopezjimenez, N. D., Tessarollo, L., Inoue, M., Bachmanov, A. A., & Sullivan, S. L. (2010). Taste function in mice with a targeted mutation of the pkd113 gene. *Chem Senses*, *35*(7), 565-577. doi: 10.1093/chemse/bjq070
- Norgren, R. (1978). Projections from the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience*, *3*(2), 207-218.
- Nygaard, R., Frimurer, T. M., Holst, B., Rosenkilde, M. M., & Schwartz, T. W. (2009). Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures. *Trends Pharmacol Sci*, *30*(5), 249-259. doi: 10.1016/j.tips.2009.02.006
- Oike, H., Nagai, T., Furuyama, A., Okada, S., Aihara, Y., Ishimaru, Y., . . . Abe, K. (2007). Characterization of ligands for fish taste receptors. *J Neurosci*, *27*(21), 5584-5592. doi: 10.1523/jneurosci.0651-07.2007
- Oka, Y., Butnaru, M., von Buchholtz, L., Ryba, N. J., & Zuker, C. S. (2013). High salt recruits aversive taste pathways. *Nature*, *494*(7438), 472-475. doi: 10.1038/nature11905
- Okin, D., & Medzhitov, R. (2012). Evolution of inflammatory diseases. *Current Biology*, *22*(17), R733-R740.
- Oksenberg, D., Marsters, S. A., O'Dowd, B. F., Jin, H., Havlik, S., Peroutka, S. J., & Ashkenazi, A. (1992). A single amino-acid difference confers major pharmacological variation between human and rodent 5-HT<sub>1B</sub> receptors. *Nature*, *360*(6400), 161-163. doi: 10.1038/360161a0
- Onofrio, A., Parisi, G., Punzi, G., Todisco, S., Di Noia, M. A., Bossis, F., . . . Pierri, C. L. (2014). Distance-dependent hydrophobic-hydrophobic contacts in protein folding simulations. *Phys Chem Chem Phys*, *16*(35), 18907-18917. doi: 10.1039/c4cp01131g
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., . . . Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, *289*(5480), 739-745.

- Palmer, S., Hughes, K. T., Lee, D. Y., & Wakelam, M. J. (1989). Development of a novel, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-specific binding assay. Its use to determine the intracellular concentration of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> in unstimulated and vasopressin-stimulated rat hepatocytes. *Cell Signal*, 1(2), 147-156.
- Pareek, A., Suthar, M., Rathore, G. S., & Bansal, V. (2011). Feverfew (*Tanacetum parthenium* L.): A systematic review. *Pharmacogn Rev*, 5(9), 103-110. doi: 10.4103/0973-7847.79105
- Peeters, M. C., van Westen, G. J., Li, Q., & AP, I. J. (2011). Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation. *Trends Pharmacol Sci*, 32(1), 35-42. doi: 10.1016/j.tips.2010.10.001
- Peng, J. Y., Vaidehi, N., Hall, S. E., & Goddard, W. A., 3rd. (2006). The predicted 3D structures of the human M1 muscarinic acetylcholine receptor with agonist or antagonist bound. *ChemMedChem*, 1(8), 878-890. doi: 10.1002/cmdc.200600047
- Perea-Martinez, I., Nagai, T., & Chaudhari, N. (2013). Functional cell types in taste buds have distinct longevities. *PLoS One*, 8(1), e53399. doi: 10.1371/journal.pone.0053399
- Perez, C. A., Huang, L., Rong, M., Kozak, J. A., Preuss, A. K., Zhang, H., . . . Margolskee, R. F. (2002). A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells. *Nat Neurosci*, 5(11), 1169-1176. doi: 10.1038/nn952
- Pioszak, A. A., Parker, N. R., Suino-Powell, K., & Xu, H. E. (2008). Molecular recognition of corticotropin-releasing factor by its G-protein-coupled receptor CRFR1. *J Biol Chem*, 283(47), 32900-32912. doi: 10.1074/jbc.M805749200
- Preininger, A. M., Meiler, J., & Hamm, H. E. (2013). Conformational flexibility and structural dynamics in GPCR-mediated G protein activation: a perspective. *J Mol Biol*, 425(13), 2288-2298. doi: 10.1016/j.jmb.2013.04.011
- Pronin, A. N., Tang, H., Connor, J., & Keung, W. (2004). Identification of ligands for two human bitter T2R receptors. *Chem Senses*, 29(7), 583-593. doi: 10.1093/chemse/bjh064
- 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(16), 1403-1408. doi: 10.1016/j.cub.2007.07.046
- Qin, L., Kufareva, I., Holden, L. G., Wang, C., Zheng, Y., Zhao, C., . . . Handel, T. M. (2015). Structural biology. Crystal structure of the chemokine receptor CXCR4 in complex with a viral chemokine. *Science*, 347(6226), 1117-1122. doi: 10.1126/science.1261064
- Rands, E., Candelore, M. R., Cheung, A. H., Hill, W. S., Strader, C. D., & Dixon, R. A. (1990). Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation. *J Biol Chem*, 265(18), 10759-10764.
- Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., . . . Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383-387. doi: 10.1038/nature06325
- Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., . . . Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549-555. doi: 10.1038/nature10361
- Ray, R. B., Raychoudhuri, A., Steele, R., & Nerurkar, P. (2010). Bitter melon (*Momordica charantia*) extract inhibits breast cancer cell proliferation by modulating cell cycle regulatory genes and promotes apoptosis. *Cancer Res*, 70(5), 1925-1931. doi: 10.1158/0008-5472.can-09-3438
- Reece, J., Urry, L. A., Meyers, N., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., . . . Cooke, B. N. (2011). *Campbell biology*: Pearson Higher Education AU.
- Reichling, C., Meyerhof, W., & Behrens, M. (2008). Functions of human bitter taste receptors depend on N-glycosylation. *J Neurochem*, 106(3), 1138-1148.

- Richter, T. A., Dvoryanchikov, G. A., Roper, S. D., & Chaudhari, N. (2004). Acid-sensing ion channel-2 is not necessary for sour taste in mice. *J Neurosci*, *24*(16), 4088-4091. doi: 10.1523/jneurosci.0653-04.2004
- Robinett, K. S., Koziol-White, C. J., Akoluk, A., An, S. S., Panettieri, R. A., Jr., & Liggett, S. B. (2014). Bitter taste receptor function in asthmatic and nonasthmatic human airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *50*(4), 678-683. doi: 10.1165/rcmb.2013-0439RC
- 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*(4), e94451. doi: 10.1371/journal.pone.0094451
- Roland, W. S., Vincken, J. P., Gouka, R. J., van Buren, L., Gruppen, H., & Smit, G. (2011). Soy isoflavones and other isoflavonoids activate the human bitter taste receptors hTAS2R14 and hTAS2R39. *J Agric Food Chem*, *59*(21), 11764-11771.
- Romanov, R. A., Rogachevskaja, O. A., Khokhlov, A. A., & Kolesnikov, S. S. (2008). Voltage dependence of ATP secretion in mammalian taste cells. *J Gen Physiol*, *132*(6), 731-744. doi: 10.1085/jgp.200810108
- Roper, S. D. (2013). Taste buds as peripheral chemosensory processors. *Semin Cell Dev Biol*, *24*(1), 71-79. doi: 10.1016/j.semcdb.2012.12.002
- Rosenbaum, D. M., Cherezov, V., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G., Thian, F. S., Kobilka, T. S., . . . Kobilka, B. K. (2007). GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. *Science*, *318*(5854), 1266-1273. doi: 10.1126/science.1150609
- Ross, J. J., Arnason, J. T., & Birnboim, H. C. (1999). Low concentrations of the feverfew component parthenolide inhibit in vitro growth of tumor lines in a cytostatic fashion. *Planta Med*, *65*(2), 126-129. doi: 10.1055/s-1999-13972
- Rosler, P., Boekhoff, I., Tareilus, E., Beck, S., Breer, H., & Freitag, J. (2000). G protein betagamma complexes in circumvallate taste cells involved in bitter transduction. *Chem Senses*, *25*(4), 413-421.
- Rosler, P., Kroner, C., Freitag, J., Noè, J., & Bree, H. (1998). Identification of a phospholipase C  $\beta$  subtype in rat taste cells. *European journal of cell biology*, *77*(3), 253-261.
- Roudnitzky, N., Behrens, M., Engel, A., Kohl, S., Thalmann, S., Hubner, S., . . . Meyerhof, W. (2015). Receptor Polymorphism and Genomic Structure Interact to Shape Bitter Taste Perception. *PLoS Genet*, *11*(9), e1005530. doi: 10.1371/journal.pgen.1005530
- Roudnitzky, N., Bufo, B., Thalmann, S., Kuhn, C., Gunn, H. C., Xing, C., . . . Wooding, S. P. (2011). Genomic, genetic and functional dissection of bitter taste responses to artificial sweeteners. *Hum Mol Genet*, *20*(17), 3437-3449.
- Ruiz-Cancino, A., Cano, A. E., & Delgado, G. (1993). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. *mexicana*. *Phytochemistry*, *33*(5), 1113-1115.
- Ruiz, C. J., Wray, K., Delay, E., Margolskee, R. F., & Kinnamon, S. C. (2003). Behavioral evidence for a role of  $\alpha$ -gustducin in glutamate taste. *Chemical Senses*, *28*(7), 573-579.
- Runge, S., Thogersen, H., Madsen, K., Lau, J., & Rudolph, R. (2008). Crystal structure of the ligand-bound glucagon-like peptide-1 receptor extracellular domain. *J Biol Chem*, *283*(17), 11340-11347. doi: 10.1074/jbc.M708740200
- Sainz, E., Cavenagh, M. M., Gutierrez, J., Battey, J. F., Northup, J. K., & Sullivan, S. L. (2007). Functional characterization of human bitter taste receptors. *Biochem J*, *403*(3), 537-543.
- Sakurai, T., Misaka, T., Ishiguro, M., Masuda, K., Sugawara, T., Ito, K., . . . Abe, K. (2010). Characterization of the beta-D-glucopyranoside binding site of the human bitter taste receptor hTAS2R16. *J Biol Chem*, *285*(36), 28373-28378.
- Salom, D., Lodowski, D. T., Stenkamp, R. E., Le Trong, I., Golczak, M., Jastrzebska, B., . . . Palczewski, K. (2006). Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate

- of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(44), 16123-16128. doi: 10.1073/pnas.0608022103
- 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(9), 4439-4449. doi: 10.1021/acs.jctc.5b00472
- Seifert, J. G., Nelson, A., Devonish, J., Burke, E. R., & Stohs, S. J. (2011). Effect of acute administration of an herbal preparation on blood pressure and heart rate in humans. *Int J Med Sci*, 8(3), 192-197.
- Serrano-Vega, M. J., Magnani, F., Shibata, Y., & Tate, C. G. (2008). Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(3), 877-882. doi: 10.1073/pnas.0711253105
- Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade, K. L., Stephenson, K. K., & Talalay, P. (2001). Chemoprotective glucosinolates and isothiocyanates of broccoli sprouts: metabolism and excretion in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(5), 501-508.
- Sharma, K., Ahuja, G., Hussain, A., Balfanz, S., Baumann, A., & Korsching, S. I. (2016). Elimination of a ligand gating site generates a supersensitive olfactory receptor. *Sci Rep*, 6, 28359. doi: 10.1038/srep28359
- Shi, P., & Zhang, J. (2006). Contrasting modes of evolution between vertebrate sweet/umami receptor genes and bitter receptor genes. *Mol Biol Evol*, 23(2), 292-300. doi: 10.1093/molbev/msj028
- Shi, P., & Zhang, J. (2009). Extraordinary diversity of chemosensory receptor gene repertoires among vertebrates. *Results Probl Cell Differ*, 47, 1-23. doi: 10.1007/400\_2008\_4
- Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., . . . Iwata, S. (2011). Structure of the human histamine H1 receptor complex with doxepin. *Nature*, 475(7354), 65-70. doi: 10.1038/nature10236
- Shukla, A. K., Reinhart, C., & Michel, H. (2006). Comparative analysis of the human angiotensin II type 1a receptor heterologously produced in insect cells and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 349(1), 6-14. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.210
- Simon, S. A., de Araujo, I. E., Gutierrez, R., & Nicolelis, M. A. (2006). The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. *Nat Rev Neurosci*, 7(11), 890-901. doi: 10.1038/nrn2006
- Singh, N., Pydi, S. P., Upadhyaya, J., & Chelikani, P. (2011). Structural basis of activation of bitter taste receptor T2R1 and comparison with Class A G-protein-coupled receptors (GPCRs). *J Biol Chem*, 286(41), 36032-36041.
- Slack, J. P., Brockhoff, A., Batram, C., Menzel, S., Sonnabend, C., Born, S., . . . Meyerhof, W. (2010). Modulation of bitter taste perception by a small molecule hTAS2R antagonist. *Curr Biol*, 20(12), 1104-1109.
- Steed, W., Turner, D. R., & Wallace, K. (2007). *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*: Wiley.
- Steiner. (1977). Facial expressions of the neonate infant indicate the hedonics of food - related chemical stimuli. *Weiffenbach, J.M. (ed): Taste and Development: The Genesis of Sweet Preference*.
- Steiner, T., & Koellner, G. (2001). Hydrogen bonds with pi-acceptors in proteins: frequencies and role in stabilizing local 3D structures. *J Mol Biol*, 305(3), 535-557. doi: 10.1006/jmbi.2000.4301
- Steiner, T., Schreurs, A. M., Kanters, J. A., & Kroon, J. (1998). Water molecules hydrogen bonding to aromatic acceptors of amino acids: the structure of Tyr-Tyr-Phe dihydrate and a crystallographic database study on peptides. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54(Pt 1), 25-31.



- Stevens, D. R., Seifert, R., Bufe, B., Muller, F., Kremmer, E., Gaus, R., . . . Lindemann, B. (2001). Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature*, *413*(6856), 631-635. doi: 10.1038/35098087
- Stewart, R. E., DeSimone, J. A., & Hill, D. L. (1997). New perspectives in a gustatory physiology: transduction, development, and plasticity. *Am J Physiol*, *272*(1 Pt 1), C1-26.
- Strader, C. D., Candelore, M. R., Hill, W. S., Sigal, I. S., & Dixon, R. A. (1989). Identification of two serine residues involved in agonist activation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, *264*(23), 13572-13578.
- Strader, C. D., Sigal, I. S., Register, R. B., Candelore, M. R., Rands, E., & Dixon, R. A. (1987). Identification of residues required for ligand binding to the beta-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(13), 4384-4388.
- Suryanarayana, S., & Kobilka, B. K. (1993). Amino acid substitutions at position 312 in the seventh hydrophobic segment of the beta 2-adrenergic receptor modify ligand-binding specificity. *Mol Pharmacol*, *44*(1), 111-114.
- Suzuki-Hashido, N., Hayakawa, T., Matsui, A., Go, Y., Ishimaru, Y., Misaka, T., . . . Imai, H. (2015). Rapid Expansion of Phenylthiocarbamide Non-Tasters among Japanese Macaques. *PLoS One*, *10*(7), e0132016. doi: 10.1371/journal.pone.0132016
- Suzuki, N., Sugawara, T., Matsui, A., Go, Y., Hirai, H., & Imai, H. (2010). Identification of non-taster Japanese macaques for a specific bitter taste. *Primates*, *51*(4), 285-289. doi: 10.1007/s10329-010-0209-3
- Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z., Dvoryanchikov, G., Li, A., . . . Foskett, J. K. (2013). CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature*, *495*(7440), 223-226. doi: 10.1038/nature11906
- Tassorelli, C., Greco, R., Morazzoni, P., Riva, A., Sandrini, G., & Nappi, G. (2005). Parthenolide is the component of tanacetum parthenium that inhibits nitroglycerin-induced Fos activation: studies in an animal model of migraine. *Cephalalgia*, *25*(8), 612-621. doi: 10.1111/j.1468-2982.2005.00915.x
- Thalmann, S., Behrens, M., & Meyerhof, W. (2013). Major haplotypes of the human bitter taste receptor TAS2R41 encode functional receptors for chloramphenicol. *Biochem Biophys Res Commun*, *435*(2), 267-273. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.066
- Thompson, A. A., Liu, W., Chun, E., Katritch, V., Wu, H., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the nociceptin/orphanin FQ receptor in complex with a peptide mimetic. *Nature*, *485*(7398), 395-399. doi: 10.1038/nature11085
- Tokuriki, N., & Tawfik, D. S. (2009). Protein dynamism and evolvability. *Science*, *324*(5924), 203-207. doi: 10.1126/science.1169375
- 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*(40), 10840-10848. doi: 10.1523/jneurosci.1863-07.2007
- Travers, J. B. (1988). Efferent projections from the anterior nucleus of the solitary tract of the hamster. *Brain Res*, *457*(1), 1-11.
- 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*(19), 7376-7380.
- Underwood, C. R., Garibay, P., Knudsen, L. B., Hastrup, S., Peters, G. H., Rudolph, R., & Reedtz-Runge, S. (2010). Crystal structure of glucagon-like peptide-1 in complex with the extracellular domain of the glucagon-like peptide-1 receptor. *J Biol Chem*, *285*(1), 723-730. doi: 10.1074/jbc.M109.033829
- Upadhyaya, J., Pydi, S. P., Singh, N., Aluko, R. E., & Chelikani, P. (2010). Bitter taste receptor T2R1 is activated by dipeptides and tripeptides. *Biochem Biophys Res Commun*, *398*(2), 331-335.

- Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., & Kinnamon, S. C. (2015). Mice Lacking Pannexin 1 Release ATP and Respond Normally to All Taste Qualities. *Chem Senses*, *40*(7), 461-467. doi: 10.1093/chemse/bjv034
- Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., Parnes, J., Enjoji, K., Robson, S. C., Finger, T. E., & Kinnamon, S. C. (2013). Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(36), 14789-14794. doi: 10.1073/pnas.1309468110
- Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., & Kinnamon, S. C. (2008). Amiloride-sensitive channels in type I fungiform taste cells in mouse. *BMC Neurosci*, *9*, 1. doi: 10.1186/1471-2202-9-1
- Vardanyan, R., & Hruby, V. (2006). *Synthesis of essential drugs*: Elsevier.
- Wacker, D., Wang, C., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2013). Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, *340*(6132), 615-619. doi: 10.1126/science.1232808
- Wang, C., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Huang, X. P., Liu, W., . . . Stevens, R. C. (2013). Structure of the human smoothed receptor bound to an antitumour agent. *Nature*, *497*(7449), 338-343. doi: 10.1038/nature12167
- Wang, J. C., Hinrichs, A. L., Bertelsen, S., Stock, H., Budde, J. P., Dick, D. M., . . . Goate, A. M. (2007). Functional variants in TAS2R38 and TAS2R16 influence alcohol consumption in high-risk families of African-American origin. *Alcohol Clin Exp Res*, *31*(2), 209-215. doi: 10.1111/j.1530-0277.2006.00297.x
- Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., . . . Schertler, G. F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, *454*(7203), 486-491. doi: 10.1038/nature07101
- Weikert, S., Rotter, A., Scherer, H., & Holzl, M. (2008). [Picrotoxin in the treatment of Meniere's disease]. *Laryngorhinootologie*, *87*(12), 862-866. doi: 10.1055/s-2008-1077389
- White, J. F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., . . . Grisshammer, R. (2012). Structure of the agonist-bound neurotensin receptor. *Nature*, *490*(7421), 508-513. doi: 10.1038/nature11558
- Witas, H. W., & Zawicki, P. (2004). Mitochondrial DNA and human evolution: A review. *Anthropol. Rev*, *67*, 97-110.
- Wong, G. T. (1996). Transduction of bitter and sweet taste by gustducin. *Nature*, *381*(6585), 796-800. doi: 10.1038/381796a0
- Wooding, S. (2006b). Phenylthiocarbamide: a 75-year adventure in genetics and natural selection. *Genetics*, *172*(4), 2015-2023.
- Wooding, S., Bufe, B., Grassi, C., Howard, M. T., Stone, A. C., Vazquez, M., . . . Bamshad, M. J. (2006a). Independent evolution of bitter-taste sensitivity in humans and chimpanzees. *Nature*, *440*(7086), 930-934. doi: 10.1038/nature04655
- 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*(4), 637-646. doi: 10.1086/383092
- Wu, B., Chien, E. Y., Mol, C. D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., . . . Stevens, R. C. (2010). Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, *330*(6007), 1066-1071. doi: 10.1126/science.1194396
- Wu, H., Wacker, D., Mileni, M., Katritch, V., Han, G. W., Vardy, E., . . . Stevens, R. C. (2012). Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*, *485*(7398), 327-332. doi: 10.1038/nature10939
- Wu, S. V., Rozengurt, N., Yang, M., Young, S. H., Sinnett-Smith, J., & Rozengurt, E. (2002). Expression of bitter taste receptors of the T2R family in the gastrointestinal tract and enteroendocrine STC-1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(4), 2392-2397. doi: 10.1073/pnas.042617699

- Xu, F., Wu, H., Katritch, V., Han, G. W., Jacobson, K. A., Gao, Z. G., . . . Stevens, R. C. (2011). Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. *Science*, 332(6027), 322-327. doi: 10.1126/science.1202793
- Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J. (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2), 234-244. doi: 10.1016/j.cell.2009.10.001
- Yee, C. L., Yang, R., Bottger, B., Finger, T. E., & Kinnamon, J. C. (2001). "Type III" cells of rat taste buds: immunohistochemical and ultrastructural studies of neuron-specific enolase, protein gene product 9.5, and serotonin. *J Comp Neurol*, 440(1), 97-108.
- Ye, W., Chang, R. B., Bushman, J. D., Tu, Y.H., Mulhall, E.M., Wilson, C. E., . . . & Kinnamon, S. C. (2016). The K<sup>+</sup> channel KIR<sub>2.1</sub> functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction., *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 113(2), 229-238.
- Zaccheddu. (2008). *Ab initio study of the optical properties of Green Fluorescent Protein*. Universiteit Leiden.
- Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D. H., Fung, J. J., Palmer, D., Zheng, Y., . . . Kobilka, B. K. (2012). High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*, 492(7429), 387-392. doi: 10.1038/nature11701
- Zhang, C. H., Lifshitz, L. M., Uy, K. F., Ikebe, M., Fogarty, K. E., & ZhuGe, R. (2013). The cellular and molecular basis of bitter tastant-induced bronchodilation. *PLoS Biol*, 11(3), e1001501. doi: 10.1371/journal.pbio.1001501
- Zhang, K., Zhang, J., Gao, Z. G., Zhang, D., Zhu, L., Han, G. W., . . . Zhao, Q. (2014). Structure of the human P2Y<sub>12</sub> receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*, 509(7498), 115-118. doi: 10.1038/nature13083
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., . . . Ryba, N. J. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, 112(3), 293-301.
- Zhao, H., Li, J., & Zhang, J. (2015). Molecular evidence for the loss of three basic tastes in penguins. *Curr Biol*, 25(4), R141-142. doi: 10.1016/j.cub.2015.01.026
- Zhao, H., Zhou, Y., Pinto, C. M., Charles-Dominique, P., Galindo-Gonzalez, J., Zhang, S., & Zhang, J. (2010). Evolution of the sweet taste receptor gene Tas1r2 in bats. *Mol Biol Evol*, 27(11), 2642-2650. doi: 10.1093/molbev/msq152

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Lokalisation der Geschmacksrezeptoren auf der Zunge	3
Abbildung 2:	Signaltransduktion der Bitterwahrnehmung	6
Abbildung 3:	Aktivierung der TAS2R-Familie mit 82 von 104 getesteten Substanzen	8
Abbildung 4:	Lokalisation der 25 Bitterrezeptoren auf den Chromosomen 5, 7 und 12	11
Abbildung 5:	PCR-basierte Punktmutagenese	25
Abbildung 6:	Kalziumkonzentrationsmessung über einen Kalzium-sensitiven Farbstoff	32
Abbildung 7:	Positionsbenennung nach Ballesteros-Weinstein-Nummerierung	36
Abbildung 8:	3D Homologiemodell des Rezeptors TAS2R14	38
Abbildung 9:	2D-Schlangenmodell des TAS2R14	39
Abbildung 10:	Testsubstanzen für die funktionelle Untersuchung der TAS2R14-Rezeptormutanten	41
Abbildung 11:	Beispielhafte idealisierte Dosis-Wirkungs-Kurven verschiedener Agonistentypen	42
Abbildung 12:	nichtkovalente Wechselwirkungen	45
Abbildung 13:	Aktivierung der Rezeptormutanten der Positionen 66 <sup>2.61</sup> und 89 <sup>3.32</sup>	47
Abbildung 14:	Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position 186 <sup>5.46</sup>	48
Abbildung 15:	Aktivierung der Rezeptormutanten der Positionen 243 <sup>6.51</sup> und 247 <sup>6.55</sup>	49
Abbildung 16:	Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position 86 <sup>3.29</sup>	50
Abbildung 17:	Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position 90 <sup>3.33</sup>	51
Abbildung 18:	Aktivierung der Rezeptormutanten der Positionen 93 <sup>3.36</sup> und 240 <sup>6.48</sup>	52
Abbildung 19:	Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position 266 <sup>7.39</sup>	53
Abbildung 20:	Aktivierung der punktmultierten Rezeptorvarianten an der Position 269 <sup>7.42</sup>	54
Abbildung 21:	Derweitertes Testsubstanzen-Set für die funktionelle Untersuchung der TAS2R14-Rezeptormutanten	56
Abbildung 22:	Rezeptoraktivierung mit dem erweiterten Testsubstanzen-Set (Teil1)	57
Abbildung 23:	Rezeptoraktivierung mit dem erweiterten Testsubstanzen-Set (Teil2)	58
Abbildung 24:	Docking-Modell Aristolochiasäure	63
Abbildung 25:	Docking-Modell von Flufenaminsäure	64
Abbildung 26:	Docking-Modelle von Pikrotoxinin	65
Abbildung 27:	Docking-Modelle von Santonin	67
Abbildung 28:	Docking-Modelle von Parthenolid	68
Abbildung 29:	Ausrichtung der Sesquiterpenlactone in der Bindungstasche	69
Abbildung 30:	Docking-Modelle von Thujon	70

---

Abbildung 31: Docking-Modelle von Genistein	71
Abbildung 32: Vergleich der TAS2R13 und TAS2R14 Sequenzen	72
Abbildung 33: TAS2R14 Rezeptorchimären mit extrazellulären Schleifen des TAS2R13	75
Abbildung 34: Verschiedene Pharmakophormodelle für ausgewählte TAS2R14-Agonisten	80
Abbildung 35: Vorhergesagte und bestätigte TAS2R14-Agonisten aus der BitterDB	82
Abbildung 36: Vorhergesagte TAS2R14-Agonisten aus der Drugbank	83
Abbildung 37: Vorhergesagte und bestätigte TAS2R14-Agonisten aus der BitterDB	84
Abbildung 38: Modifikation von Coumarin	89
Abbildung 39: Modifikation von Guaifenesin	91
Abbildung 40: Modifikation von Mefenaminsäure	93
Abbildung 41: Modifikation von Diclofenac	94
Abbildung 42: Modifikation von Benzoin	95
Abbildung 43: 2D-Darstellung der Interaktion von Mefenaminsäure, Diclofenac und Benzoin mit den Aminosäureresten des TAS2R14	96
Abbildung 44: Docking-Modell von allen Testsubstanzen	102
Abbildung 45: Vektorkarte des pcDNA5 / FRT	137
Abbildung 46: Klonierungskassette mit dem TAS2R14 Gen	137
Abbildung 47: Mutageneseschema zum Austausch von extrazellulären Schleifen	141
Abbildung 48: Mutageneseschema zum Austausch von extrazellulären Schleifen	142
Abbildung 49: Plattenschemata für Dosis-Wirkungs-Kurven	143
Abbildung 50: Plattenschema für die Messung von Bittersubstanzen	143
Abbildung 51: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil I)	155
Abbildung 52: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil II)	156
Abbildung 53: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil III)	157
Abbildung 54: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil IV)	158
Abbildung 55: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil V)	159
Abbildung 56: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil VI)	160
Abbildung 57: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil VII)	161
Abbildung 58: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil VIII)	162
Abbildung 59: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil IX)	163
Abbildung 60: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil X)	164
Abbildung 61: Eigenschaften der Aminosäuren (AS)	167

---

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenstellung von veröffentlichten GPCR-Bindungstaschenanalysen	16
Tabelle 2: Vergleich der homologen Positionen des TAS2R14, -R10, -R46 und -R13	40
Tabelle 3: Funktionelle Charakterisierung der TAS2R14-Alanin-Punktmutanten	43
Tabelle 4: Funktionelle Charakterisierung detaillierter punktmutierte TAS2R14 Rezeptorvarianten	55
Tabelle 5: Mögliche Interaktionsarten zwischen den Aminosäuren und dem jeweiligen Agonist	61
Tabelle 6: Funktionelle Charakterisierung des TAS2R14 mit den extrazellulären Schleifen (ECLs) des TAS2R13	76
Tabelle 7: Rangliste der Aktivierungspotenzen und -effizienzen für die TAS2R14-Agonisten	86
Tabelle 8: Sequenz der Mutageneseprimer	138
Tabelle 9: Sequenz der Mutageneseprimer für die TAS2R13-Mutagenese	139
Tabelle 10: Sequenz der Primer für den Austausch von Schleifen im TAS2R14	140
Tabelle 11: Sequenz der Primer für den Austausch von Schleifen im TAS2R13	140
Tabelle 12: Funktionelle Charakterisierung der punktmutierten TAS2R14 Rezeptorvarianten	153
Tabelle 13: Ausschnitt aus publizierten Kristallstrukturuntersuchungen	165
Tabelle 14: Aminosäuren mit Angaben des 3 bzw. 1 Buchstaben Code und der Triplets	166

## 10. Anhang

### 10.1 DNA- und Aminosäure-Sequenz des TAS2R14 und TAS2R13

#### TAS2R14 taste receptor, type 2, member 14 [ *Homo sapiens* (human) ]

Gene ID: 50840, updated on 9-Nov-2014

NCBI Reference Sequence: NM\_023922.1 (Chr12/ c10939207-10938254)

>gi|12965181|ref|NM\_023922.1| Homo sapiens taste receptor, type 2, member 14 (TAS2R14), mRNA

```
ATGGGTGGTGTGCATAAAGAGCATATTTACATTCGTTTTAATTGTGGAAATTTATAATTGGAAATTTAGGAAATAGTTT
CATAGCACTGGTGAAGTGTATTGACTGGGTCAAGGGAAGAAAGATCTCTTCGGTTGATCGGATCCTCACTGCTTTGG
CAATCTCTCGAATTAGCCTGGTTTTGGTTAATATTCGGAAGCTGGTGTGTGTCTGTGTTTTTCCCAGCTTTATTTGCC
ACTGAAAAAATGTTTCAAGATGCTTACTAATATCTGGACAGTGATCAATCATTTTAGTGTCTGGTTAGCTACAGGCCT
CGGTACTTTTTATTTTCTCAAGATAGCCAATTTTTCTAACTCTATTTTTCTCTACCTAAAAGTGGAGAGTTAAAAAGG
TGTTTTGGTGTCTGCTTCTTGTGACTTCGGTCTTCTTGTTTTTAAATATTGCACTGATAAACATCCATATAAATGCC
AGTATCAATGGATACAGAAGAAACAAGACTTGCAGTTCTGATTCAGTAACTTTACACGATTTTCCAGTCTTATTGT
ATTAACCAGCACTGTGTTTCATTTTTCATACCCCTTTACTTTGTCCCTGGCAATGTTTCTCTCCATCTTCTCCATGT
GGAAACATCGCAAGAAGATGCAGCACACTGTCAAAATATCCGGAGACGCCAGCACCAAAAGCCCACAGAGGAGTTAAA
AGTGTGATCACTTTCTTCTACTCTATGCCATTTTCTCTCTGTCTTTTTTTCATATCAGTTTGGACCTCTGAAAGGTT
GGAGGAAAATCTAATTATTCTTTCCCAGGTGATGGGAATGGCTTATCCTTCATGTCACTCATGTGTTCTGATTCTTG
GAAACAAGAAGCTGAGACAGGCCTCTCTGTGCTACTGTGGCTGAGGTACATGTTCAAAGATGGGGAGCCCTCA
GGTCACAAAGAATTTAGAGAATCATCTTGA
```

#### TAS2R14 Protein

UniProtKB/Swiss-Prot: Q9NYV8.1

```
M G G V I K S I F T F V L I V E F I I G N L G N S F I A L V N C I D W V K G R
K I S S V D R I L T A L A I S R I S L V W L I F G S W C V S V F F P A L F A T
E K M F R M L T N I W T V I N H F S V W L A T G L G T F Y F L K I A N F S N S
I F L Y L K W R V K K V V L V L L L V T S V F L F L N I A L I N I H I N A S I
N G Y R R N K T C S S D S S N F T R F S S L I V L T S T V F I F I P F T L S L
A M F L L L I F S M W K H R K K M Q H T V K I S G D A S T K A H R G V K S V I
T F F L L Y A I F S L S F F I S V W T S E R L E E N L I I L S Q V M G M A Y P
S C H S C V L I L G N K K L R Q A S L S V L L W L R Y M F K D G E P S G H K E
F R E S S
```

#### TAS2R13 taste receptor, type 2, member 13 [ *Homo sapiens* (human) ]

Gene ID: 50838, updated on 9-Nov-2014

```
ATGGAAAGTGCCCTGCCGAGTATCTTCACTCTTGTAAATAATTGCAGAATTCATAATTGGGAATTTGAGCAATGGATT
TATAGTACTGATCAACTGCATTGACTGGGTCAAGGGAAGAGAGCTGTCTCAGTCGATAAACTCCTCATTATCTTGG
CAATCTCCAGAATTGGGCTGATCTGGGAAATATTAGTAAGTTGGTTTTTGGCTCTGCATTATCTAGCCATATTTGTG
TCTGGAACAGGATTAAGAATTATGATTTTTAGCTGGATAGTTTCTAATCACTTCAATCTCTGGCTTGCTACAATCTT
CAGCATCTTTTATTTGCTCAAAATAGCGAGTTTCTCTAGCCCTGCTTTTCTCTATTTGAAAGTGGAGAGTAAACAAAG
TGATTCTGATGATACTGCTAGGAACCTTGGTCTTCTTATTTTTAAATCTGATACAAATAAACATGCATATAAAAGAC
TGGCTGGACCGATATGAAAGAAACACAACCTTGAATTTTCAAGTATGAGTGACTTTGAAACATTTTCAAGTGTCTGGTCAA
ATTCACTATGACTATGTTTCACTTAACACCACTTTACTGTGGCCTTCACTCTTTTCTCCTGTTAATTTTCTCCCTGC
AGAAACATCTCCAGAAAATGCAACTCAATTACAAAGGACACAGAGACCCCAAGGACCAAGGTCCATACAAATGCCTTG
AAAATTGTGATCTCATTCTTTTATTCTATGCTAGTTTCTTTCTATGTGTTCTCATATCATGGATTTCTGAGCTGTA
TCAGAGCACAGTGATCTACATGCTTTGTGA
```

## TAS2R13 Protein

M E S A L P S I F T L V I I A E F I I G N L S N G F I V L I N C I D W V S K R  
 E L S S V D K L L I I L A I S R I G L I W E I L V S W F L A L H Y L A I F V S  
 G T G L R I M I F S W I V S N H F N L W L A T I F S I F Y L L K I A S F S S P  
 A F L Y L K W R V N K V I L M I L L G T L V F L F L N L I Q I N M H I K D W L  
 D R Y E R N T T W N F S M S D F E T F S V S V K F T M T M F S L T P F T V A F  
 I S F L L L I F S L Q K H L Q K M Q L N Y K G H R D P R T K V H T N A L K I V  
 I S F L L F Y A S F F L C V L I S W I S E L Y Q S T V I Y M L C E T I G V F S  
 P S S H S F L L I L G N A K L R Q A F L L V A A K V W A K R

## 10.2 Vektorkarte und Klonierungskassette mit Sst3-Epitop und HSV-Epitop

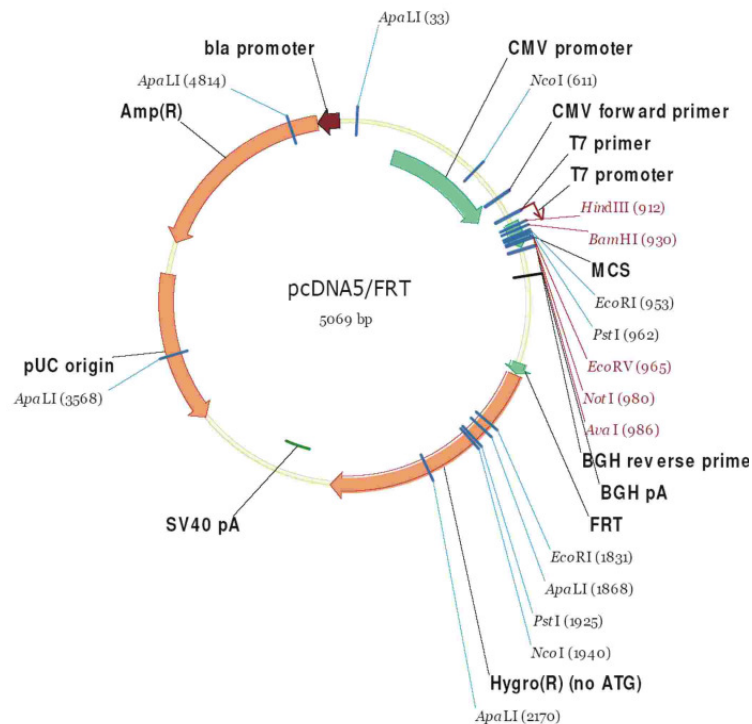


Abbildung 45: Vektorkarte des pcDNA5 / FRT

Die EcoRI-Schnittstelle (1931) wurde durch Punktmutation aus dem Vektor pcDNA5/FRT entfernt und wird als Vektor pcDNA5FRT PM bezeichnet (Bufe et al., 2002).

**AAGCTT**GGATCCGCCACC**ATG**GCCGCTGTTACCTATCCTTCATCCGTGCCTACGACCTTGGACCCTGGGA  
**ATGCATCCTCAGCCTGGCCCCTGGACACGTCCCTGGGGAATGCATCTGCTGGCACTAGCCTGGCAGGACT**  
**GGCTGTCAGTGGC****GAATTC**  
 ATGGGTGGTGTGCATAAAGAGCATATTTACATTCGTTTTAATTGTGGAATTTATAATTGGAAATTTAGGAAATAGTTT  
 CATAGCACTGGTGAAGTATTGACTGGGTCAAGGGAAGAAAGATCTCTTCGGTTGATCGGATCCTCACTGCTTTGG  
 CAATCTCTCGAATTAGCCTGGTTTTGGTTAATATTCGGAAGCTGGTGTGTGTCTGTGTTTTTCCCAGCTTTATTTGCC  
 ACTGAAAAAATGTTCAAGATGCTTACTAATATCTGGACAGTGATCAATCATTTTAGTGTCTGGTTAGCTACAGGCCT  
 CGGTACTTTTTATTTTCTCAAGATAGCCAATTTTTCTAACTCTATTTTTCTCTACCTAAAAGTGGAGGGTTAAAAAGG  
 TGGTTTTGGTGTCTTCTTGTGACTTCGGTCTTCTGTTTTTAAATATTGCACTGATAAACATCCATATAAAATGCC  
 AGTATCAATGGATACAGAAGAAACAAGACTTGCAGTTCTGATTCAAGTAACTTTACACGATTTCCAGTCTTATTGT  
 ATTAACCAGCACTGTGTTTCATTTTCATACCCTTTACTTTGTCCCTGGCAATGTTCTTCTCCTCATCTTCTCCATGT  
 GGAAACATCGCAAGAAGATGCAGCACACTGTCAAAATATCCGGAGACGCCAGCACCAAAGCCACAGAGGAGTTAAA  
 AGTGTGATCACTTTCTTCTACTCTATGCCATTTCTCTCTGTCTTTTTTCATATCAGTTTGGACCTCTGAAAGGTT  
 GGAGGAAAATCTAATTATTCTTTCCCAGGTGATGGGAAATGGCTTATCCTTCATGTCACCTCATGTGTTCTGATTCTTG  
 GAAACAAGAAGCTGAGACAGGCCTCTCTGTGAGTGTACTGTGGCTGAGGTACATGTTCAAAGATGGGGAGCCCTCA  
 GGTCAAAAGAATTTAGAGAATCATCTG**GCGGCCGC****CAGCCTGAACTCGCTCCTGAAGATCCGGAAGATTAA**TCTAG  
 A**GGGCC**

Abbildung 46: Klonierungskassette mit dem TAS2R14 Gen

Die Sequenzen der Enzym-Schnittstellen wurden mit einem Rahmen versehen (HindIII: AAGCTT, EcoRI: GAATTC, NotI: GCGGCCGC, ApaI: GGGCCC), der SSTR3\_RAT-Epitope-Tag (Teil des Somatostatin Rezeptor 3 der Ratte (*Rattus norvegicus*)) wurde in fett gedruckten Buchstaben dargestellt (NCBI: NM\_133522.1 (135bp) / NP\_598206.1 (45AS)) und der HSV-Epitope-Tag (11 AS des Glycoprotein-D-Proteins vom humanen Herpesvirus (*herpes simplex virus*)) unterstrichen und fettgedruckt (UniProtKB/Swiss-Prot: P06476.1).



### 10.3 Mutageneseprimer für die Erzeugung von Mutationen im TAS2R14

Tabelle 8: Sequenz der Mutageneseprimer

(Primererstellung und Mutagenese durch \*Claudia Deutschmann, \*\*Marta Pratelli oder \*\*\*Ulrike Redel)

Position	Primername	Primersequenz ( 5' → 3' Richtung)	
CMV	CMV-f	CGCAAATGGGCGGTAGGCCGTG	
BGH	BGH r	TAGAAGGCACAGTCGAGG	
W66A	TAS2R14_W66A_f	GTTAATATTCGGAAGCGCGTGTGTGTC	*
	TAS2R14_W66A_r	GACACACACGCGCTTCCGAATATTAAC	*
W66F	TAS2R14_W66F_f	GTTAATATTCGGAAGCTTTTGTGTGTCTG	
	TAS2R14_W66F_r	CAGACACACAAAAGCTTCCGAATATTAAC	
L85A	TAS2R14_L85A_f	GTTCAGAATGGCTACTAATATC	*
	TAS2R14_L85A_r	GATATTAGTAGCCATTCTGAAC	*
T86A	TAS2R14_T86A_f	GTTCAGATTGCTTGCTAATATCTGGAC	*
	TAS2R14_T86A_r	GTCCAGATATTAGCAAGCAATCTGAAC	*
T86I	TAS2R14_T86I_f	GTTCAGAATGCTTATTAATATCTGGACAGTG	
	TAS2R14_T86I_r	CACTGTCCAGATATTAATAAGCATTCTGAAC	
T86S	TAS2R14_T86S_f	GTTCAGAATGCTTAGTAATATCTGGACAG	
	TAS2R14_T86S_r	CTGTCCAGATATTACTAAGCATTCTGAAC	
T86V	TAS2R14_T86V_f	GTTCAGAATGCTTGTTAATATCTGGACAGTG	
	TAS2R14_T86V_r	CACTGTCCAGATATTAACAAGCATTCTGAAC	
N87A	TAS2R14_N87A_f	GAATGCTTACTGCTATCTGGACAG	*
	TAS2R14_N87A_r	CTGTCCAGATAGCAGTAAGCATTCT	*
W89A	TAS2R14_W89A_f	GAATGCTTACTAATATCGCGACAGTGATCAATC	*
	TAS2R14_W89A_r	GATTGATCACTGTCGCGATATTAGTAAGCATTCT	*
W89F	TAS2R14_W89F_f	GCTTACTAATATCTTTACAGTGATCAATC	
	TAS2R14_W89F_r	GATTGATCACTGTAAAGATATTAGTAAGC	
W89Y	TAS2R14_W89Y_f	GCTTACTAATATCTACACAGTGATCAATC	
	TAS2R14_W89Y_r	GATTGATCACTGTGTAGATATTAGTAAGC	
T90A	TAS2R14_T90A_f	GCTTACTAATATCTGGGCAGTGATCAATC	*
	TAS2R14_T90A_r	GATTGATCACTGCCAGATATTAGTAAGC	*
T90I	TAS2R14_T90I_f	CTTACTAATATCTGGATAGTGATCAATCATTTTAG	
	TAS2R14_T90I_r	CTAAAATGATTGATCACTATCCAGATATTAGTAAG	
N93A	TAS2R14_N93A_f	GACAGTGATCGCTCATTTTAGTG	*
	TAS2R14_N93A_r	CACTAAAATGAGCGATCACTGTC	*
N93Q	TAS2R14_H94A_f	GACAGTGATCCAACATTTTAGTG	**
	TAS2R14_H94A_r	CACTAAAATGTTGGATCACTGTC	**
H94A	TAS2R14_H94A_f	CTGACAGTGATCAATGCTTTTAGTGTCTG	
	TAS2R14_H94A_r	CAGACACTAAAAGCATTGATCACTGTCAG	
H94E	TAS2R14_H94E_f	CAGTGATCAATGAGTTTAGTGTCTG	***
	TAS2R14_H94E_r	CAGACACTAAACTCATTGATCACTG	***
T182A	TAS2R14_T182A_f	CTTCTTTAGCCAGCACTGTG	**
	TAS2R14_T182A_r	CACAGTGCTGGCTAAGAGAAG	**
T183A	TAS2R14_T183A_f	GTATTAACCGCCACTGTGTTC	***
	TAS2R14_T183A_r	GAACACAGTGCCGTTAATAC	***
F186A	TAS2R14_F186A_f	CAGCACTGTGGCCATTTTCATAC	**
	TAS2R14_F186A_r	GTATGAAAATGGCCACAGTGCTG	**
F186L	TAS2R14_F186L_f	CAGCACTGTGTTGATTTTCATACCCTTTAC	
	TAS2R14_F186L_r	GTAAGGGTATGAAAATCAACACAGTGCTG	

Weiterführung der Tabelle 8:

Position	Primername	Primersequenz ( 5' → 3' Richtung)	
F186Y	TAS2R14_F186Y_f	CAGCACTGTGTACATTTTCATACCCTTTAC	
	TAS2R14_F186Y_r	GTAAGGGTATGAAAATGTACACAGTGCTG	
1187A	TAS2R14_1187A_f	CACTGTGTTTCGCTTTTCATACC	**
	TAS2R14_1187A_r	GGTATGAAAGCGAACACAGTG	**
1187L	TAS2R14_1187L_f	CAGCACTGTGTTCTTATTCATACCCTTTAC	
	TAS2R14_1187L_r	GTAAGGGTATGAATAAGAACACAGTGCTG	
1187V	TAS2R14_1187V_f	GCACTGTGTTTCGTTTTTCATACCCTTTAC	
	TAS2R14_1187V_r	GTAAGGGTATGAAAACGAACACAGTGCTG	
1234S	TAS2R14_1234S_f	GTTAAAAGTGTGAGCACTTTCTTC	***
	TAS2R14_1234S_r	GAAGAAAGTGCTCACACTTTTAAC	***
A241I	TAS2R14_A241I_f	CTTCCTACTCTATATCATTTTCTCTCTGTC	***
	TAS2R14_A241I_r	GACAGAGAGAAAATGATATAGAGTAGGAAG	***
Y240A	TAS2R14_Y240A_f	CTTTCTCCTACTCGCTGCCATTTTCTCTC	
	TAS2R14_Y240A_r	GAGAGAAAATGGCAGCGAGTAGGAAGAAAAG	
Y240F	TAS2R14_Y240F_f	CTTTCTCCTACTCTTTGCCATTTTCTCTCTG	
	TAS2R14_Y240F_r	CAGAGAGAAAATGGCAAAGAGTAGGAAGAAAAG	
F243A	TAS2R14_F243A_f	CTATGCCATTGCCTCTCTGTC	*
	TAS2R14_F243A_r	GACAGAGAGGCAATGGCATAG	*
F243Y	TAS2R14_F243Y_f	CTACTCTATGCCATTTACTCTCTGTCTTTTTTC	
	TAS2R14_F243Y_r	GAAAAAAGACAGAGAGTAAATGGCATAGAGTAG	
F247A	TAS2R14_F247A_f	CTCTCTGTCTGCTTTTCATATCAGTTTGG	*
	TAS2R14_F247A_r	CCAAACTGATATGAAAGCAGACAGAGAG	*
F247V	TAS2R14_F247V_f	CATTTTCTCTCTGTCTGTTTTTCATATCAGTTTGG	
	TAS2R14_F247V_r	CAAACCTGATATGAAAACAGACAGAGAGAAAATG	
F247Y	TAS2R14_F247Y_f	CATTTTCTCTCTGTCTTATTTTCATATCAGTTTGGAC	
	TAS2R14_F247Y_r	GTCCAACTGATATGAAATAAGACAGAGAGAAAATG	
I263A	TAS2R14_I263A_f	GAAAATCTAATTGCTCTTTCCAGGTG	*
	TAS2R14_I263A_r	CACCTGGGAAAGAGCAATTAGATTTTC	*
Q266A	TAS2R14_Q266A_f	CTAATTATTCTTTCCGCGGTGATGG	*
	TAS2R14_Q266A_r	CCATCACCGCGGAAAGAATAATTAG	*
Q266E	TAS2R14_Q266E_f	CTAATTATTCTTTCCGAGGTGATGGGAATG	
	TAS2R14_Q266E_r	CATTTCCATCACCTCGGAAAGAATAATTAG	
Q266L	TAS2R14_Q266L_f	CTAATTATTCTTTCCCTGGTATGGGAATG	
	TAS2R14_Q266L_r	CATTTCCATCACCGGAAAGAATAATTAG	
Q266N	TAS2R14_Q266N_f	CTAATTATTCTTTCCAACGTGATGGGAATGGC	
	TAS2R14_Q266N_r	GCCATTTCCATCACGTTGAAAGAATAATTAG	
G269A	TAS2R14_G269A_f	CAGGTGATGGCAATGGCTTATC	
	TAS2R14_G269A_r	GATAAGCCATTGCCATCACCTG	
G269I	TAS2R14_G269I_f	CTTTCCAGGTGATGATAATGGCTTATCCTTC	
	TAS2R14_G269I_r	GAAGGATAAGCCATTATCATCACCTGGGAAAG	

## 10.4 Mutageneseprimer für die Erzeugung von Mutationen im TAS2R13

Tabelle 9: Sequenz der Mutageneseprimer für die TAS2R13-Mutagenese

Position	Primername	Primersequenz ( 5' → 3' Richtung)
186T	TAS2R13_186T_for	GATTAAGAATTATGACTTTTAGCTGGATAGTTTC
	TAS2R13_186T_rev	GAAACTATCCAGCTAAAAGTCATAATTCTTAATC
190T	TAS2R13_190T_for	GATTTTATGCTGGACAGTTTCTAATCACTTC
	TAS2R13_190T_rev	GAAGTGATTAGAACTGTCCAGCTAAAAATC
V247F	TAS2R13_V247F_for	GTTTCTTTCTATGTTTTCTCATATCATGGATTTTC
	TAS2R13_V247F_rev	GAAATCCATGATATGAGAAAACATAGAAAAGAAAC
E267Q	TAS2R13_E267Q_for	CTACATGCTTTGTCAGACGATTGGAGTC
	TAS2R13_E267Q_rev	GACTCCAATCGTCTGACAAAGCATGTAG

## 10.5 Primer für den Austausch der extrazellulären Schleifen

Tabelle 10: Sequenz der Primer für den Austausch von Schleifen im TAS2R14

Position	Primername	Primersequenz ( 5' → 3' Richtung)
N-terminus	TAS2R14_NTerm_f	GCTGGGCGAATTCATGGAAAGTGCATAAAGAGC
	TAS2R14_NTerm_r	GCTCTTTATGACACTTTCCATGAATTCGCC
ECL 1	TAS2R14_ECL1_f	TATCTAGCCATATTTGTGTCTGAAAAAATGTTTCAGAATG
	TAS2R14_ECL1_r	AGACACAAATATGGCTAGATAAAACACAGACACACACCAG
ECL 2	TAS2R14_ECL2_f	CAGTATGAGTGACTTTGAAACATTTTCCAGTCTTATTGTATTAAC
	TAS2R14_ECL2_r	CAGCCAGTCTTTTATATGCATGTTTATCAGTGCAATATTTAAAAAC
ECL 2* 13er Template	TAS2R14_ECL2_M_f	ATGCATATAAAAGACTGGCTG
	TAS2R14_ECL2_M_r	TGTTTCAAAGTCACTCATACTG
ECL 3 (259 Serin)	TAS2R14_ECL3_f	GCTGTATCAGAGCACAGTGCTAATTATTCTTTCCAGGTG
	TAS2R14_ECL3_r	GTGCTCTGATACAGCTCAGACCAAAGTATGAAAAAAGACAGAG

Tabelle 11: Sequenz der Primer für den Austausch von Schleifen im TAS2R13

Position	Primername	Primersequenz ( 5' → 3' Richtung)
N-terminus	TAS2R13_NTerm_f	GAATTCATGGGTGGTGCCCTGCCG
	TAS2R13_NTerm_r	CGGCAGGGCACCACCCATGAATTC
ECL 1	TAS2R13_ECL1_f	TTCCAGCTTTATTTGCCACTGGAACAGGATTAAGAATTATG
	TAS2R13_ECL1_r	AGTGGCAAATAAAGCTGGGAAATGCAGAGCTAAAAACCAAC
ECL 2	TAS2R13_ECL2_f	CTGATTCAAGTAACTTTACACGATTTTTCAGTGTCTGGTCAAATTC
	TAS2R13_ECL2_r	GATACTGGCATTATATGGATGTTTATTTGTATCAGATTTAAAAATAAC
ECL 2* 14er Template	TAS2R13_ECL2_M_f	ATCCATATAAATGCCAGTATC
	TAS2R13_ECL2_M_r	TCGTGTAAAGTTACTTGAATCAG
ECL 3 (259 Serin)	TAS2R13_ECL3_f	CTCTGAAAGGTTGGAGGAAAATATCTACATGCTTTGTGAGAC
	TAS2R13_ECL3_r	CCTCCAACCTTTTCAGAGGTAATCCATGATATGAGAACACATAG

## 10.6 Mutageneseschema: Austausch der extrazellulären Schleifen

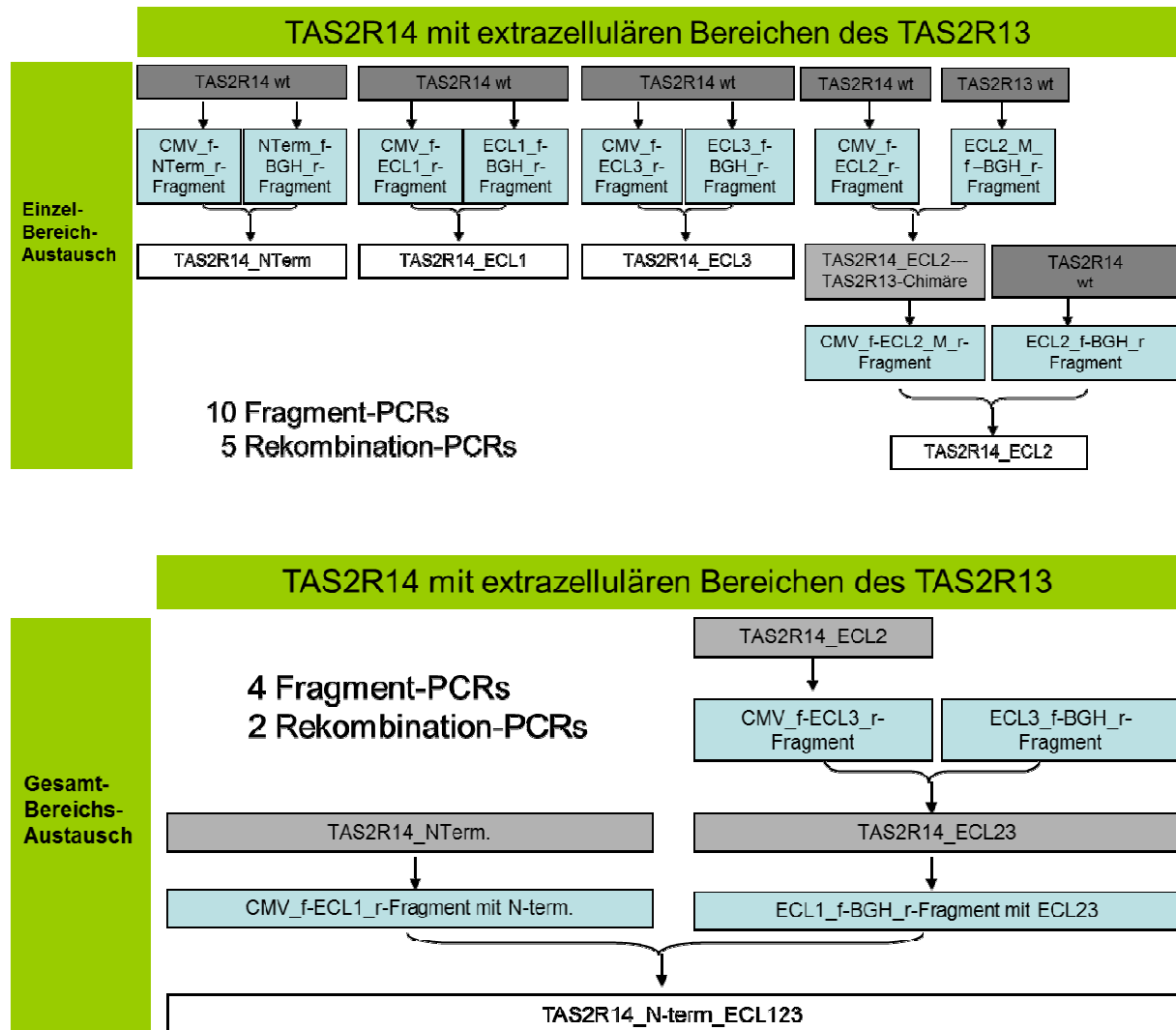


Abbildung 47: Mutageneseschema zum Austausch von extrazellulären Schleifen

Dargestellt sind die methodischen Schritte zur Herstellung der TAS2R14-Chimären mit einzelnen extrazellulären Schleifen des TAS2R13 (oben) und der TAS2R14-Chimäre mit allen extrazellulären Schleifen des TAS2R13. Angegeben sind die genutzten Templates (dunkelgrau die Wildtyp-Konstrukte und hellgrau bereits hergestellte Chimären), das notwendige Primerpaar (hellblau, detaillierte Angaben siehe Tabelle 10 und 11) und die Endprodukte (weiß, N-term. = N-Terminus, )

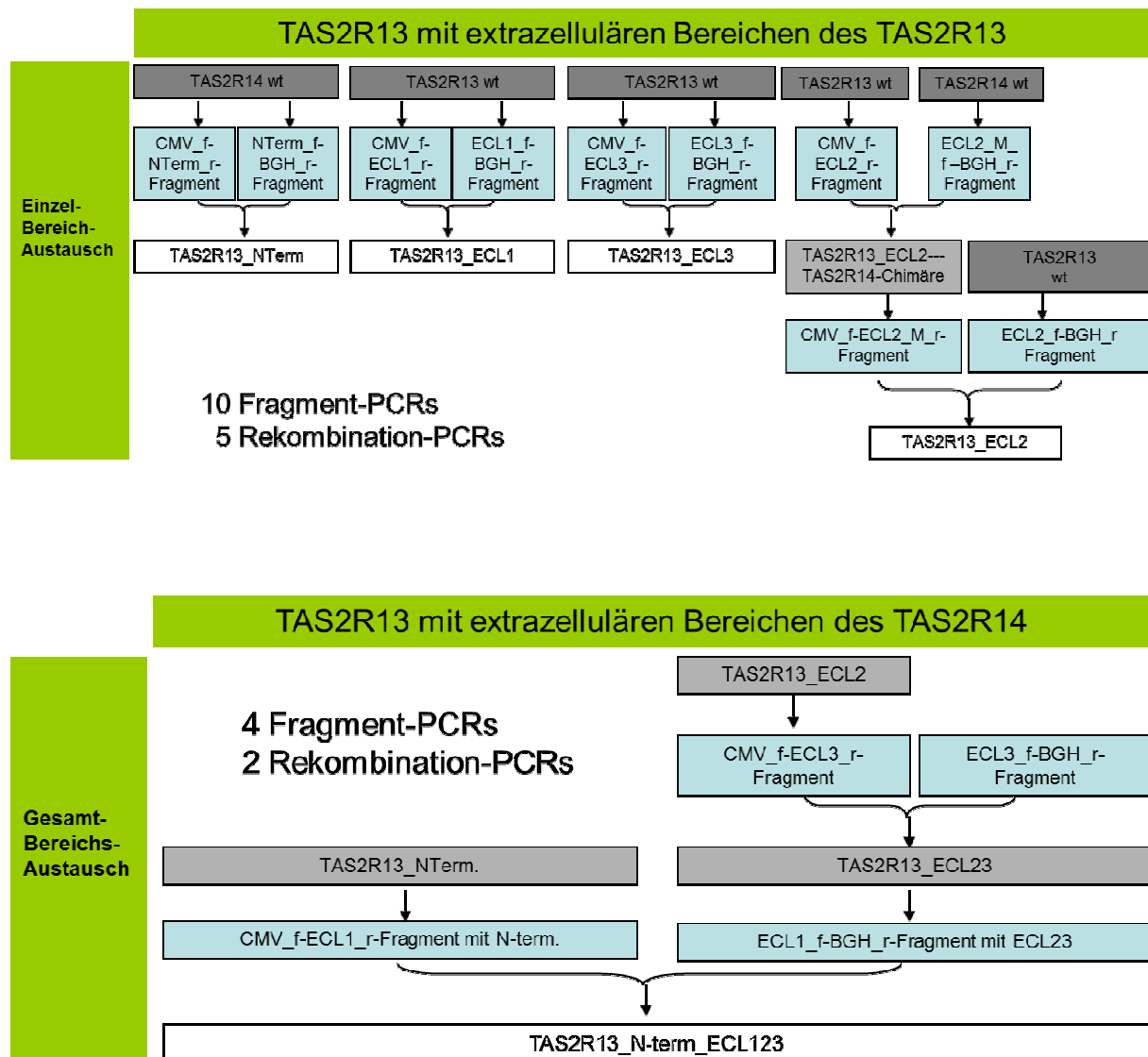


Abbildung 48: Mutageneseschema zum Austausch von extrazellulären Schleifen

Dargestellt sind die methodischen Schritte zur Herstellung der TAS2R14-Chimären mit einzelnen extrazellulären Schleifen des TAS2R13 (oben) und der TAS2R14-Chimäre mit allen extrazellulären Schleifen des TAS2R13. Angegeben sind die genutzten Templates (dunkelgrau die Wildtyp-Konstrukte und hellgrau bereits hergestellte Chimären), das notwendige Primerpaar (hellblau, detaillierte Angaben siehe Tabelle 10 und 11) und die Endprodukte (weiß, N-term. = N-Terminus, )

## 10.7 Plattenschema für die funktionellen Rezeptormessungen

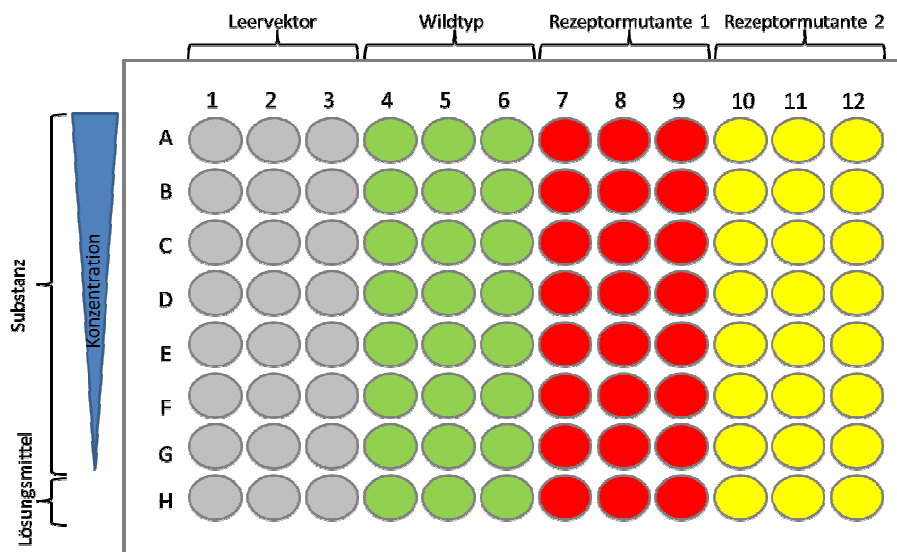


Abbildung 49: Plattenschemata für Dosis-Wirkungs-Kurven

Auf jeder Platte wurde der Leervektor (grau) als Negativkontrolle und der Wildtyp (grün) als Positivkontrolle mitgemessen. Des Weiteren wurde der C1-Puffer ohne Substanz (Reihe H) auf alle Konstrukte gemessen, um mögliche, entstandene Signale vom eigentlichen Signal abziehen zu können. Auf jeder dieser Platten konnten 2 Rezeptormutanten (rot und gelb) gemessen werden. Je Rezeptormutante wurden mindestens zwei Experimente mit Dreifachbestimmung durchgeführt.

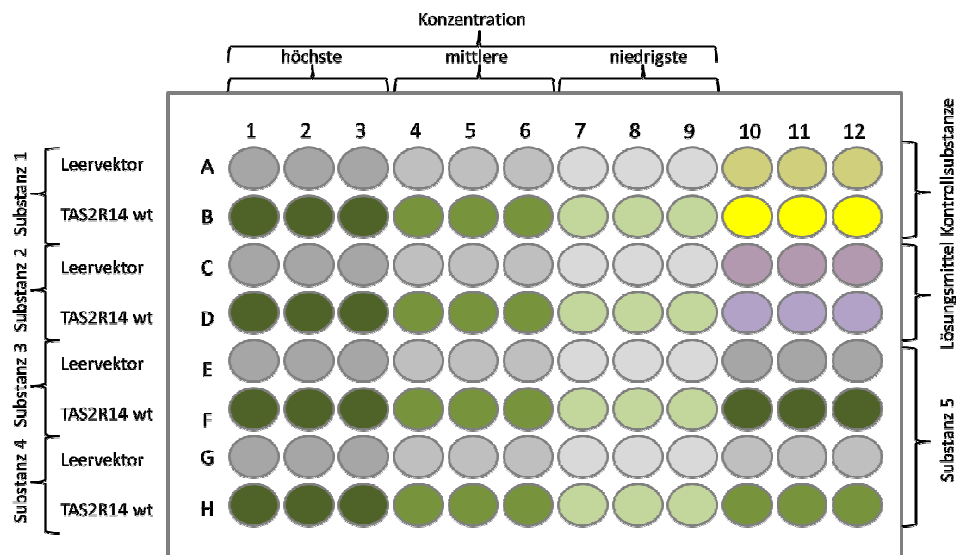


Abbildung 50: Plattenschema für die Messung von Bittersubstanzen

Alle Testsubstanzen wurden in Dreifachbestimmung in drei Konzentrationen gemessen. Messungen erfolgten auch mit dem Leervektor (dunkel grau, grau, hellgrau) und dem Wildtyprezeptor (dunkelgrün, grün und hellgrün). Die Messungen wurden mindestens an einem weiteren Messtag wiederholt. Auf jeder Platte wurden auch eine Kontrollsubstanz (Leervektor dunkel gelb und Wildtyp gelb) und der C1-Puffer ohne Substanz (Leervektor dunkel lila und Wildtyp lila) gemessen.

## 10.8 Aminosäuresequenz-Alignment und X50-Position nach Ballesteros und Weinstein

Das struktur-basierende Aminosäuresequenz-Alignment der humanen Bitterrezeptoren, den TAS2R-Familie und weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit bekannter Kristallstruktur wurde in Kooperation mit Anat Levit (The Hebrew University in Israel, Israel) durchgeführt. Die Lücken zwischen den Sequenzen wurde so angepasst, dass die größtmögliche, homologe Übereinstimmung unter den verschiedenen Proteinen dargestellt werden konnte.

Die verwendeten Rezeptoren (PDB-Code in Klammern) mit bekannter Kristallstruktur sind der humane M2 Muscarin Acetylcholin Rezeptor mit gebundenem Antagonist 3-Chinuclidinylbenzilat (3uon), der Ratten M3 Muscarin Acetylcholin Rezeptor mit gebundenem Tiotropium (4daj), der humane Histamin H1 Rezeptor im Komplex mit Doxepin (3rze), der humane  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor mit gebundenem Carazolol (2rh1), der Truthahn  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptor mit dem gebundenen Antagonist (2vt4), der humane Dopamin D3 Rezeptor mit komplexiertem Antagonist Eticlopride (3pbl), der humane Adenosin A<sub>2A</sub> Rezeptor gebundenem Agonist NECA (2ydv), der humane Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor mit Antagonist Sphingolipid (3v2w), der humane CXCR4 Chemokin Rezeptor komplexiert mit dem Antagonist IT1t (3odu), der Rinder-Rhodopsin (2i35) und der Tintenfisch Rhodopsin (2z73).

Bei den meisten Kristallisationsanalysen wurde die intrazelluläre Schleife 3 (ICL3) durch T4 Lysozym-Sequenz ersetzt, um die Stabilität während der Kristallisation zu erhöhen. Somit stand die Information der ICL3-Struktur nicht zur Verfügung.

Im Alignment wurde die konservierteste Position in jeder Transmembrandomäne mit X.50 nach Ballesteros und Weinstein markiert (gelb für die TAS2R-Familie und grün für die weiteren GPCRs).

---

```

3UON      1 -----TFEVVFI-VLVAGSLSLVTII
4DAJ      1 -----IWQVFI-AFLTGFALVTII
3RZE      1 -----MPL-VVVLSTICLVTVG
2RH1      1 -----D-----EVWVGM-GIVMSLIVLAIVF
2VT4      1 -----QWEAGM-SLLMALVLLIVA
3PBL      1 -----Y-ALSYCALILAIVF
2YDV      1 -----IMG-----SSVY-ITVELAIAVLAIL
3V2W      1 -----SDYVNYDIIVRHNYT-----GKLNISALT-SVVFILICCFIIL
3ODU      1 -----PCFRE--ENA-----NFNKIFLPTIYSIIFLTGIV
2I35      1 XMNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSFPFEAPQYY----LAEPWFQFMSL-AAVMFLLIMLGFP
2Z73      1 -----ETWWYNPSIVVHPHWREFD-----QVPDAVYYSL-GIFIGICGIIICG
TAS2R1    1 -----ML-----ESHLIY-FLLAVIQFLLGIF
TAS2R3    1 -----MM-----GLTEGVF-LILSGTQFTLGIL
TAS2R4    1 -----ML-----RLFYFSA-IIASVILNFVGII
TAS2R5    1 -----ML-----SAGLGLL-MLVAVVEFLIGLI
TAS2R7    1 -----MA-----DKVQTTL-LFLAVGEFSVGIL
TAS2R8    1 -----MF-----SPADNIF-IILITGEFILGIL
TAS2R9    1 -----MP-----SAIEAIY-IILLIAGELTIGIW
TAS2R10   1 -----ML-----RVVEGIF-IFVVVSESVFGVL
TAS2R13   1 -----ME-----SALPSIF-TLVIIAEFIIIGNL
TAS2R14   1 -----MG-----GVIKSIF-TFVLIVVEFIIIGNL
TAS2R16   1 -----MIP-----IQLTVFF-MIIVVLESLTIIIV
TAS2R38   1 -----MLTLTRIRTVS-----YEVIRSTF-LFISVLEFAVGFLL
TAS2R39   1 ----MLGRCFPPDTKEKQQLRMTKLCDPAES----ELSPFLITLI-LAVLLAEYLIIGII
TAS2R40   1 -----MATVNTDATDKD-----ISKFKVTFT-LVVSIGIECITGIL
TAS2R41   1 -----MQ-----AALTAFV-VLLFSLLSLLGIA
TAS2R43   1 -----MI-----TFLPIIF-SSLVVVTFVIGNF
TAS2R44   1 -----MT-----TFIPIIF-SSVVVLFVIGNF
TAS2R45   1 -----MI-----TFLPIIF-SILVVVTFVIGNF
TAS2R46   1 -----MI-----TFLPIIF-SILIVVTFVIGNF
TAS2R47   1 -----MI-----TFLPIIF-SILIVVIFVIGNF
TAS2R48   1 -----MM-----CFLLIIS-SILVVFVAFVLGNV
TAS2R49   1 -----MM-----SFLHIVF-SILVVVAFILGNF
TAS2R50   1 -----MI-----TFLYIFF-SILIMVLFVLGNF
TAS2R55   1 -----MA-----TELDKIF-LILAIAEFIISML
TAS2R56   1 -----MNGDHMVLGSSVTDKKAIL-VTILLLLRLVAIA

```



	1.50	2.50
3UON	↓	↓
4DAJ	21	21
3RZE	17	17
2RH1	22	22
2VT4	20	20
3PBL	15	15
2YDV	21	21
3V2W	39	39
3ODU	29	29
2I35	55	55
2Z73	43	43
TAS2R1	23	23
TAS2R3	23	23
TAS2R4	23	23
TAS2R5	23	23
TAS2R7	23	23
TAS2R8	23	23
TAS2R9	23	23
TAS2R10	23	23
TAS2R13	23	23
TAS2R14	23	23
TAS2R16	24	24
TAS2R38	32	32
TAS2R39	51	51
TAS2R40	35	35
TAS2R41	23	23
TAS2R43	23	23
TAS2R44	23	23
TAS2R45	23	23
TAS2R46	23	23
TAS2R47	23	23
TAS2R48	23	23
TAS2R49	23	23
TAS2R50	23	23
TAS2R55	23	23
TAS2R56	34	34

	3.50	4.50
	↓	↓
3UON	76 VCDLWALDYVVSNASVMNLLIISFD <sup>R</sup> YFCVTKPLT----YPVK <sup>R</sup> TTKMAGMM-IAAA <sup>V</sup>	76 VCDLWALDYVVSNASVMNLLIISFD <sup>R</sup> YFCVTKPLT----YPVK <sup>R</sup> TTKMAGMM-IAAA <sup>V</sup>
4DAJ	76 ACDLWLSIDYVASNASVMNLLVISFD <sup>R</sup> YFSITRPLT----YRAK <sup>R</sup> TTKRAGVM-IGLA <sup>V</sup>	76 ACDLWLSIDYVASNASVMNLLVISFD <sup>R</sup> YFSITRPLT----YRAK <sup>R</sup> TTKRAGVM-IGLA <sup>V</sup>
3RZE	72 LCLFWLSMDYVASTASIFSVF <sup>I</sup> LCID <sup>R</sup> YRSVQQPLR----YLYK <sup>R</sup> TKTRASAT-ILGA <sup>F</sup>	72 LCLFWLSMDYVASTASIFSVF <sup>I</sup> LCID <sup>R</sup> YRSVQQPLR----YLYK <sup>R</sup> TKTRASAT-ILGA <sup>F</sup>
2RH1	77 WCEFWTSIDVLCVTAS <sup>I</sup> ETLCVIAVD <sup>R</sup> YFAITSPFK----YQSL <sup>L</sup> TKNKARVI-ILMV <sup>I</sup>	77 WCEFWTSIDVLCVTAS <sup>I</sup> ETLCVIAVD <sup>R</sup> YFAITSPFK----YQSL <sup>L</sup> TKNKARVI-ILMV <sup>I</sup>
2VT4	75 LCELWTSLDVLCVTAS <sup>I</sup> ETLCVIAID <sup>R</sup> YLAITSPFR----YQSL <sup>M</sup> TRARAKVI-ICTV <sup>A</sup>	75 LCELWTSLDVLCVTAS <sup>I</sup> ETLCVIAID <sup>R</sup> YLAITSPFR----YQSL <sup>M</sup> TRARAKVI-ICTV <sup>A</sup>
3PBL	71 CCDVFVTL <sup>D</sup> VMCTAS <sup>I</sup> WNLCASID <sup>R</sup> YTA <sup>V</sup> VMPVHYQ-HGTGQSSCRVALM-ITAV <sup>V</sup>	71 CCDVFVTL <sup>D</sup> VMCTAS <sup>I</sup> WNLCASID <sup>R</sup> YTA <sup>V</sup> VMPVHYQ-HGTGQSSCRVALM-ITAV <sup>V</sup>
2YDV	74 GCLFIACFVLTASSIFSLLAIAID <sup>R</sup> YIAIRIPLR----YNGLV <sup>T</sup> GTRAKGI-IAIC <sup>V</sup>	74 GCLFIACFVLTASSIFSLLAIAID <sup>R</sup> YIAIRIPLR----YNGLV <sup>T</sup> GTRAKGI-IAIC <sup>V</sup>
3V2W	93 QWFLREGSMFVALSASVFSLLAIAIE <sup>R</sup> YITMLK-----NNFRL <sup>F</sup> LL-ISAC <sup>V</sup>	93 QWFLREGSMFVALSASVFSLLAIAIE <sup>R</sup> YITMLK-----NNFRL <sup>F</sup> LL-ISAC <sup>V</sup>
3ODU	82 LCKAVHVIYTVNLYSSVWILAFISLD <sup>R</sup> YLAIVHAT-----NSQR <sup>P</sup> RKLLAEKVYVGV <sup>I</sup>	82 LCKAVHVIYTVNLYSSVWILAFISLD <sup>R</sup> YLAIVHAT-----NSQR <sup>P</sup> RKLLAEKVYVGV <sup>I</sup>
2I35	110 GCNLEGFATLGG <sup>E</sup> IALW <sup>S</sup> LVLAI <sup>E</sup> RYV <sup>V</sup> VCKPMS-----NFR <sup>F</sup> GENHAIMG-VAFT <sup>V</sup>	110 GCNLEGFATLGG <sup>E</sup> IALW <sup>S</sup> LVLAI <sup>E</sup> RYV <sup>V</sup> VCKPMS-----NFR <sup>F</sup> GENHAIMG-VAFT <sup>V</sup>
2Z73	99 ACKVYGF <sup>I</sup> GG <sup>I</sup> FGFMS <sup>I</sup> MTMAMISID <sup>R</sup> YNV <sup>I</sup> GRPMAAS----KKMS <sup>H</sup> RRAFIM-IIFV <sup>L</sup>	99 ACKVYGF <sup>I</sup> GG <sup>I</sup> FGFMS <sup>I</sup> MTMAMISID <sup>R</sup> YNV <sup>I</sup> GRPMAAS----KKMS <sup>H</sup> RRAFIM-IIFV <sup>L</sup>
TAS2R1	77 MCSANCAILLFINELELWLATWLG <sup>V</sup> FYCAKVASVRHPLFIWLK <sup>M</sup> RISKLV <sup>P</sup> WM-IL <sup>G</sup> SLL	77 MCSANCAILLFINELELWLATWLG <sup>V</sup> FYCAKVASVRHPLFIWLK <sup>M</sup> RISKLV <sup>P</sup> WM-IL <sup>G</sup> SLL
TAS2R3	81 IMQIIDVSWTFTNHL <sup>S</sup> IWLATCLG <sup>V</sup> LYCL <sup>K</sup> IASFSHPTFLWLK <sup>R</sup> VR <sup>S</sup> VMV <sup>W</sup> M-LL <sup>G</sup> GALL	81 IMQIIDVSWTFTNHL <sup>S</sup> IWLATCLG <sup>V</sup> LYCL <sup>K</sup> IASFSHPTFLWLK <sup>R</sup> VR <sup>S</sup> VMV <sup>W</sup> M-LL <sup>G</sup> GALL
TAS2R4	80 LSAFFVLCFMFLDSSSVWFVTLN <sup>I</sup> LYCV <sup>K</sup> ITNFQHSVFLLLK <sup>R</sup> NI <sup>S</sup> PKIP <sup>R</sup> L-LL <sup>A</sup> CVL	80 LSAFFVLCFMFLDSSSVWFVTLN <sup>I</sup> LYCV <sup>K</sup> ITNFQHSVFLLLK <sup>R</sup> NI <sup>S</sup> PKIP <sup>R</sup> L-LL <sup>A</sup> CVL
TAS2R5	77 WLRYLSIFWV <sup>L</sup> VSQAS <sup>L</sup> WFATFLSV <sup>F</sup> YCK <sup>I</sup> ITTFDRPAYLWLK <sup>Q</sup> RAYNLSL <sup>W</sup> C-LL <sup>G</sup> YFI	77 WLRYLSIFWV <sup>L</sup> VSQAS <sup>L</sup> WFATFLSV <sup>F</sup> YCK <sup>I</sup> ITTFDRPAYLWLK <sup>Q</sup> RAYNLSL <sup>W</sup> C-LL <sup>G</sup> YFI
TAS2R7	81 EMRIIDFFWTLNHL <sup>S</sup> IWFATCLSI <sup>Y</sup> YFF <sup>K</sup> IGNFFHPLFLW <sup>M</sup> K <sup>R</sup> IDR <sup>V</sup> ISW <sup>I</sup> -LL <sup>G</sup> CVV	81 EMRIIDFFWTLNHL <sup>S</sup> IWFATCLSI <sup>Y</sup> YFF <sup>K</sup> IGNFFHPLFLW <sup>M</sup> K <sup>R</sup> IDR <sup>V</sup> ISW <sup>I</sup> -LL <sup>G</sup> CVV
TAS2R8	81 QQIVIFTFWTFANYLNMW <sup>I</sup> ITTC <sup>L</sup> NV <sup>F</sup> YFL <sup>K</sup> IASSSHPLFLWLK <sup>W</sup> KIDM <sup>V</sup> VHW <sup>I</sup> -LL <sup>G</sup> CF	81 QQIVIFTFWTFANYLNMW <sup>I</sup> ITTC <sup>L</sup> NV <sup>F</sup> YFL <sup>K</sup> IASSSHPLFLWLK <sup>W</sup> KIDM <sup>V</sup> VHW <sup>I</sup> -LL <sup>G</sup> CF
TAS2R9	81 LVSIVNVVWTFANNS <sup>L</sup> WFTSCLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANISHPFFF <sup>W</sup> LK <sup>L</sup> KINK <sup>V</sup> MLAI-LL <sup>G</sup> SFL	81 LVSIVNVVWTFANNS <sup>L</sup> WFTSCLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANISHPFFF <sup>W</sup> LK <sup>L</sup> KINK <sup>V</sup> MLAI-LL <sup>G</sup> SFL
TAS2R10	80 LIEYISYFWVIGNQSSM <sup>W</sup> FATLSI <sup>F</sup> YFL <sup>K</sup> IANFSNYIFLWLK <sup>S</sup> R <sup>T</sup> NM <sup>V</sup> LP <sup>F</sup> M-IV <sup>F</sup> LLI	80 LIEYISYFWVIGNQSSM <sup>W</sup> FATLSI <sup>F</sup> YFL <sup>K</sup> IANFSNYIFLWLK <sup>S</sup> R <sup>T</sup> NM <sup>V</sup> LP <sup>F</sup> M-IV <sup>F</sup> LLI
TAS2R13	81 GLRIMIFSWIVSNHFN <sup>L</sup> WLATIFSIF <sup>Y</sup> LL <sup>K</sup> IASFSSPAFLYLK <sup>W</sup> RVN <sup>K</sup> VIL <sup>M</sup> I-LL <sup>G</sup> TLV	81 GLRIMIFSWIVSNHFN <sup>L</sup> WLATIFSIF <sup>Y</sup> LL <sup>K</sup> IASFSSPAFLYLK <sup>W</sup> RVN <sup>K</sup> VIL <sup>M</sup> I-LL <sup>G</sup> TLV
TAS2R14	81 MFRMLTN <sup>I</sup> WTVINHF <sup>S</sup> VWLATGLG <sup>T</sup> FYFL <sup>K</sup> IANFSNSIFLWLK <sup>W</sup> RVK <sup>V</sup> V <sup>V</sup> L <sup>V</sup> L-LL <sup>V</sup> TSV	81 MFRMLTN <sup>I</sup> WTVINHF <sup>S</sup> VWLATGLG <sup>T</sup> FYFL <sup>K</sup> IANFSNSIFLWLK <sup>W</sup> RVK <sup>V</sup> V <sup>V</sup> L <sup>V</sup> L-LL <sup>V</sup> TSV
TAS2R16	77 VLCNLIT <sup>I</sup> WEFFN <sup>I</sup> LTFW <sup>L</sup> NSL <sup>T</sup> TV <sup>F</sup> YCI <sup>K</sup> VSSFTHHIFLWL <sup>R</sup> WR <sup>I</sup> LRL <sup>F</sup> P <sup>W</sup> I-LL <sup>G</sup> S <sup>L</sup> M	77 VLCNLIT <sup>I</sup> WEFFN <sup>I</sup> LTFW <sup>L</sup> NSL <sup>T</sup> TV <sup>F</sup> YCI <sup>K</sup> VSSFTHHIFLWL <sup>R</sup> WR <sup>I</sup> LRL <sup>F</sup> P <sup>W</sup> I-LL <sup>G</sup> S <sup>L</sup> M
TAS2R38	91 SYQAIIMLWMIANQANLWLAAC <sup>L</sup> SLL <sup>Y</sup> CSK <sup>L</sup> IRFSHTFLIC <sup>L</sup> ASVWSR <sup>K</sup> ISQ <sup>M</sup> -LL <sup>G</sup> IIL	91 SYQAIIMLWMIANQANLWLAAC <sup>L</sup> SLL <sup>Y</sup> CSK <sup>L</sup> IRFSHTFLIC <sup>L</sup> ASVWSR <sup>K</sup> ISQ <sup>M</sup> -LL <sup>G</sup> IIL
TAS2R39	109 VYYAFKISFIFLN <sup>F</sup> CSL <sup>W</sup> FAAWLS <sup>F</sup> FYFV <sup>K</sup> IANFSYPLFLK <sup>L</sup> R <sup>W</sup> RITGLIP <sup>W</sup> L-LW <sup>L</sup> SVF	109 VYYAFKISFIFLN <sup>F</sup> CSL <sup>W</sup> FAAWLS <sup>F</sup> FYFV <sup>K</sup> IANFSYPLFLK <sup>L</sup> R <sup>W</sup> RITGLIP <sup>W</sup> L-LW <sup>L</sup> SVF
TAS2R40	93 VYILFKVITVFLNHSNLWFAAWL <sup>K</sup> VFYCL <sup>R</sup> IANFNHPLFFL <sup>M</sup> K <sup>R</sup> KIIV <sup>L</sup> MP <sup>W</sup> L-LR <sup>L</sup> SVL	93 VYILFKVITVFLNHSNLWFAAWL <sup>K</sup> VFYCL <sup>R</sup> IANFNHPLFFL <sup>M</sup> K <sup>R</sup> KIIV <sup>L</sup> MP <sup>W</sup> L-LR <sup>L</sup> SVL
TAS2R41	81 GRQFFHLHWHFLNSAT <sup>F</sup> WFC <sup>S</sup> WLS <sup>V</sup> LECV <sup>K</sup> IANITHSTFLWLK <sup>W</sup> R <sup>F</sup> L <sup>G</sup> W <sup>V</sup> P <sup>W</sup> L-LL <sup>G</sup> SVL	81 GRQFFHLHWHFLNSAT <sup>F</sup> WFC <sup>S</sup> WLS <sup>V</sup> LECV <sup>K</sup> IANITHSTFLWLK <sup>W</sup> R <sup>F</sup> L <sup>G</sup> W <sup>V</sup> P <sup>W</sup> L-LL <sup>G</sup> SVL
TAS2R43	80 VRTTAYNIWAVINHF <sup>S</sup> NWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNFI <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> M-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L	80 VRTTAYNIWAVINHF <sup>S</sup> NWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNFI <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> M-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L
TAS2R44	80 VRTTAYNVWAVTG <sup>H</sup> FSNWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> M-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L	80 VRTTAYNVWAVTG <sup>H</sup> FSNWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> M-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L
TAS2R45	80 LRTTAYNIWAVTG <sup>H</sup> FSNWPATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LRLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> V-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L	80 LRTTAYNIWAVTG <sup>H</sup> FSNWPATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LRLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> V-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L
TAS2R46	80 VRITAYNVWAVINHF <sup>S</sup> NWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L	80 VRITAYNVWAVINHF <sup>S</sup> NWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L
TAS2R47	80 VRITAYNVWAVTNHF <sup>S</sup> SWLATLSM <sup>F</sup> YLL <sup>R</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LRIK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L	80 VRITAYNVWAVTNHF <sup>S</sup> SWLATLSM <sup>F</sup> YLL <sup>R</sup> IANFSNLI <sup>F</sup> LRIK <sup>R</sup> RVK <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> L
TAS2R48	80 VRIVASNAWAVTNHF <sup>S</sup> MWLAASLSI <sup>F</sup> CLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>S</sup> LHLK <sup>R</sup> K <sup>R</sup> IK <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> V	80 VRIVASNAWAVTNHF <sup>S</sup> MWLAASLSI <sup>F</sup> CLL <sup>K</sup> IANFSNLI <sup>S</sup> LHLK <sup>R</sup> K <sup>R</sup> IK <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-LL <sup>G</sup> P <sup>L</sup> V
TAS2R49	80 VIIFISNAWAVTNHF <sup>S</sup> IWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IVNFSRLIF <sup>H</sup> LK <sup>R</sup> K <sup>A</sup> K <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-VL <sup>G</sup> S <sup>L</sup> F	80 VIIFISNAWAVTNHF <sup>S</sup> IWLATLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IVNFSRLIF <sup>H</sup> LK <sup>R</sup> K <sup>A</sup> K <sup>S</sup> VV <sup>L</sup> VI-VL <sup>G</sup> S <sup>L</sup> F
TAS2R50	80 LRITSYNAWVVTNHF <sup>S</sup> MWLAANLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLL <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RV <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> I-LL <sup>G</sup> T <sup>L</sup> I	80 LRITSYNAWVVTNHF <sup>S</sup> MWLAANLSI <sup>F</sup> YLL <sup>K</sup> IANFSNLL <sup>F</sup> LHLK <sup>R</sup> RV <sup>S</sup> VIL <sup>V</sup> I-LL <sup>G</sup> T <sup>L</sup> I
TAS2R55	81 LGKTVIMLW <sup>H</sup> MTNHL <sup>T</sup> WLATCLSI <sup>F</sup> YFF <sup>K</sup> IAHFP <sup>H</sup> SLFLWL <sup>R</sup> WR <sup>M</sup> NGMI <sup>V</sup> ML-LI <sup>L</sup> S <sup>L</sup> F	81 LGKTVIMLW <sup>H</sup> MTNHL <sup>T</sup> WLATCLSI <sup>F</sup> YFF <sup>K</sup> IAHFP <sup>H</sup> SLFLWL <sup>R</sup> WR <sup>M</sup> NGMI <sup>V</sup> ML-LI <sup>L</sup> S <sup>L</sup> F
TAS2R56	92 VLQFLAFQWDFLNAATL <sup>W</sup> SSTWLS <sup>V</sup> FYCV <sup>K</sup> IATFTHPV <sup>F</sup> FLK <sup>H</sup> K <sup>L</sup> SG <sup>W</sup> LP <sup>W</sup> M-LF <sup>S</sup> SVG	92 VLQFLAFQWDFLNAATL <sup>W</sup> SSTWLS <sup>V</sup> FYCV <sup>K</sup> IATFTHPV <sup>F</sup> FLK <sup>H</sup> K <sup>L</sup> SG <sup>W</sup> LP <sup>W</sup> M-LF <sup>S</sup> SVG

3UON	131	LSFILWAPAILFWQFIV--GVRTVED-----GECYI-----QF-----
4DAJ	131	ISFVLWAPAILFWQYFV--GKRTVPP-----GECFI-----QF-----
3RZE	127	LSFLW-VIPIL-GWN-----HRRE-----DKCET-----DF-----
2RH1	132	VSGLTSEFLPIQMHWRATHQEAINCYA-----EETCCDF-----
2VT4	130	ISALVSFLPIMMHWRDEDPQALKCYQ-----DPGCCDF-----
3PBL	129	LAFAV-SCPLLFGFN-----TTGDP-----TVCS-----
2YDV	129	LSFAI-GLTPMLGWN-----NCGQPK-----EGKAHSQGCQVACLFEDV-----
3V2W	140	ISLIL-GGLPIMGW-----NCI-----SALSSCSTVLP
3ODU	137	PALLL-TIPDFIFA-----NVSEA-----DDRYICDR-----FYPND-----
2I35	164	MALAC-AAPPLVGWS-----RYIPE-----GMQCSCGI-----DYTPH---EE
2Z73	154	WSVLW-AIGPIFGWG-----AYTLE-----GVLNCNSF-----DYISR-----D
TAS2R1	136	YVSMI-CVFHSHYAG-----FMVPYF-----LRKFFSQN-----ATIQQ-----
TAS2R3	140	LSCGS-TASLINEFK-----LYSVFR-----GIEATRNVTE-----HFRKK-----
TAS2R4	139	ISAFI-TCLYITLSQ-----ASFPF-----ELVTTRNN-----TSFNI-----
TAS2R5	136	INLLL-TVQIGLTFY-----HPPQ-----GNSS-----IRYPF-----
TAS2R7	140	LSVFI-SLPATENLN-----ADFRFC-----VKAKRKTNLTW-----SCRVN-----
TAS2R8	140	ISLLV-SLIAAIVLS-----CDYRFH-----AIAKHKRNI TE-----MFHVS-----
TAS2R9	140	ISLII-SVPKNDMMW-----YHLFK-----VSHEENITW-----KFKVS-----
TAS2R10	139	SLLN-FAYIAKILN-----DYK-----MKNDTVW-----DLNMY-----
TAS2R13	140	FLFLN-LIQINMHIK-----DWLDRY-----ERNTTWNF-----SMSDF-----
TAS2R14	140	FLFLN-IALINIHIN-----ASING-----YRRNKTC S-----SDSSNF-----
TAS2R16	136	ITCVT-IIPSAIGNY-----IQIQLL--TMEHLPRNSTV-----TDKLE-----
TAS2R38	150	CSCIC-TVLCVWCFF-----SRPHFTVTTLVFMNNTRL-----NWQIK-----
TAS2R39	168	ISFSH-SMFCINICT-----VYCNS--FPIHSSNSTK-----KTYLS-----
TAS2R40	152	VSLSF-SFPLSRDVF-----NVYVNS--SIPIPSSNSTE-----KKYFS-----
TAS2R41	140	ISFII-TLLFFWVNY-----PVYQEF--LIRKFSGNMTY-----KWNTR-----
TAS2R43	139	FLACH-LFVINMNEI-----VRTKE-----FEGNMTW-----KIKLK-----
TAS2R44	139	FLACQ-LFVINMKEI-----VRTKE-----YEGNMTW-----KIKLR-----
TAS2R45	139	FLACH-LFVVNMNQI-----VWTKE-----YEGNMTW-----KIKLR-----
TAS2R46	139	FLVCH-LFVINMNQI-----IWTKE-----YEGNMTW-----KIKLR-----
TAS2R47	139	FLVCH-LFVINMDET-----VWTKE-----YEGNVTW-----KIKLR-----
TAS2R48	139	FLICN-LAVITMDER-----VWTKE-----YEGNVTW-----KIKLR-----
TAS2R49	139	FLVCH-LVMKHTYIN-----VWTEE-----CEGNVTW-----KIKLR-----
TAS2R50	139	FLVCH-LLVANMDES-----MWAEE-----YEGNMTG-----KMKLR-----
TAS2R55	140	LLIFD-SLVLEIFID-----ISLNII-----DKSNLTL-----YLDES-----
TAS2R56	151	LSST-TILFFIGNH-----RMYQNYL-RNHLQPWNVTG-----DSIRS-----

## 5.50

↓

3UON	162	FSNAA---VTFGTAIAAFYL	V	I	I	M	T	V	L	Y	W	H	I	S	R	A	S	K	S	R	I	-----	
4DAJ	162	LSEPT---ITFGTAIAAFYM	V	T	I	M	T	I	L	Y	W	R	I	Y	K	E	T	E	-----	-----	-----	-----	
3RZE	151	YDVTW---FKVMTAIIIFYL	T	L	L	M	L	W	F	Y	A	K	I	Y	K	A	V	R	Q	H	C	-----	
2RH1	166	FTNQA---YAIASSIVSFYV	L	V	I	M	V	F	V	S	R	V	F	Q	E	A	K	R	Q	L	-----		
2VT4	164	VTNRA---YAIASSIISFYI	L	L	I	M	I	F	V	A	L	R	V	Y	R	E	A	K	E	Q	-----		
3PBL	152	ISNPD---FVIYSSVVSFYL	F	G	V	T	V	L	V	Y	A	R	I	Y	V	V	L	K	Q	R	R	-----	
2YDV	170	VPMNY---MVFYFNFFACVLV	L	L	L	M	L	G	V	Y	L	R	I	F	L	A	A	R	R	Q	L	-----	
3V2W	167	LYHKH---YILFCTTVF-TL	L	L	S	I	V	I	L	Y	C	R	I	Y	S	L	V	R	T	R	-----		
3ODU	168	LWVVV---FQFQHIMVGLIL	G	I	V	I	L	S	C	Y	C	I	I	S	K	L	S	H	S	-----	-----		
2I35	199	TNNES---FVIYMFVVHFI	L	I	V	I	F	F	C	Y	Q	L	V	F	T	V	K	E	A	A	-----		
2Z73	187	STTRS---NILCMFILGFFG	L	I	I	F	F	C	Y	F	N	I	V	M	S	V	S	N	H	E	-----		
TAS2R1	169	EDTLA---IQIFSVAEFSV	P	L	L	I	F	L	F	A	V	L	L	I	F	S	L	G	R	H	T	-----	
TAS2R3	175	RSEYY---LIHVLGTLWYLP	L	I	V	S	L	A	S	Y	S	L	L	I	F	S	L	G	R	H	T	-----	
TAS2R4	171	SEGIL---SLVSVLSSSLQ	F	I	I	N	V	T	S	A	S	L	L	I	H	S	L	R	R	H	I	-----	
TAS2R5	163	ESWQY---LYAFQLNSGSYL	L	V	V	F	L	V	S	S	G	M	L	I	V	S	L	Y	T	H	H	-----	
TAS2R7	176	KTQHA---STKFLNLATLL	P	F	C	V	C	L	M	S	F	F	L	L	I	L	S	L	R	R	H	-----	
TAS2R8	176	KIPYF---EPLTLFNLFAIV	P	F	I	V	S	L	I	S	F	F	L	L	V	R	S	L	W	R	H	-----	
TAS2R9	173	KIPGT---FKQLTLNLGVM	P	F	I	L	C	L	I	S	F	F	L	L	F	S	L	V	R	H	T	-----	
TAS2R10	168	KSEYF---IKQILLNLGVIF	F	F	T	L	S	L	I	T	C	I	F	L	I	S	L	W	R	H	N	-----	
TAS2R13	173	ETFSV---SVKFTMTMFSLT	P	F	T	V	A	F	I	S	F	L	L	I	F	S	L	Q	K	H	L	-----	
TAS2R14	173	TRFSS---LIVLTSTVFIF	P	F	T	L	S	L	A	M	F	L	L	I	F	S	M	W	K	H	R	-----	
TAS2R16	172	-NFHQ---YQFQAHTVALVI	P	F	I	L	F	L	A	S	T	I	F	L	M	-----	-----	-----	-----	-----	-----		
TAS2R38	188	DLNLF---YSFLFCYLWSVP	P	F	L	L	F	L	V	S	S	G	M	L	T	V	S	L	G	R	H	-----	
TAS2R39	203	EINNV---GLAFFFNLGIVT	P	L	I	M	F	I	L	T	A	T	L	L	I	L	S	L	K	R	H	-----	
TAS2R40	188	ETNMV---NLVFFYNMGIF	V	P	L	I	M	F	I	L	A	T	L	L	I	L	S	L	K	R	H	-----	
TAS2R41	176	-IETY---YFPSLKLVIWS	I	P	F	S	V	F	L	V	S	I	M	L	L	I	N	S	L	R	R	-----	
TAS2R43	170	SAMYF---SNMTVTMLANLV	P	F	T	L	L	S	F	M	L	L	I	C	S	L	C	K	H	L	-----		
TAS2R44	170	SAVYL---SDATVTTLGNLV	P	F	T	L	L	C	F	L	L	L	I	C	S	L	C	K	H	L	-----		
TAS2R45	170	RAMYL---SDTTVTMLANLV	P	F	T	V	T	L	I	S	F	L	L	V	C	S	L	C	K	H	L	-----	
TAS2R46	170	SAMYL---SNTTVTILANLV	P	F	T	L	L	I	S	F	L	L	L	I	C	S	L	C	K	H	L	-----	
TAS2R47	170	SAMYH---SNMTLTMLANFV	L	T	L	L	I	S	F	L	L	L	I	C	S	L	C	K	H	L	-----		
TAS2R48	170	NAIHL---SSLTVTTLANLV	P	F	T	L	S	L	I	C	F	L	L	L	I	C	S	L	C	K	H	L	-----
TAS2R49	170	NAMHL---SNLTVAMLANLV	P	F	T	L	L	I	S	F	L	L	L	I	Y	S	L	C	K	H	L	-----	
TAS2R50	170	NTVHL---SYLTVTTLWSFI	P	F	T	L	S	L	I	S	F	L	M	L	I	C	S	L	Y	K	H	-----	
TAS2R55	172	KTLYDKLSILKTLLSLTS	F	I	P	F	S	L	F	L	T	S	L	L	F	L	F	L	S	L	V	R	-----
TAS2R56	188	YCEKF---YLFPLKMITWMT	P	A	V	F	F	I	C	M	L	L	I	T	S	L	G	R	H	R	-----		

## 6.50

↓

3UON	199	-----PP-----PSREK <b>K</b> V <b>R</b> T <b>I</b> L <b>A</b> I <b>L</b> L <b>A</b> F <b>I</b> I <b>T</b> W <b>A</b> <b>Y</b> N <b>V</b> M <b>V</b> L <b>I</b> N <b>T</b> F-
4DAJ	196	-----K <b>L</b> I <b>K</b> E <b>A</b> Q <b>T</b> L <b>S</b> A <b>I</b> L <b>L</b> A <b>F</b> I <b>I</b> T <b>W</b> T <b>F</b> <b>Y</b> N <b>I</b> M <b>V</b> L <b>V</b> N <b>T</b> F-
3RZE	188	-----L <b>H</b> -----M <b>N</b> R <b>E</b> R <b>K</b> A <b>K</b> Q <b>L</b> G <b>F</b> I <b>M</b> A <b>A</b> F <b>I</b> L <b>C</b> W <b>I</b> <b>F</b> <b>Y</b> F <b>I</b> F <b>F</b> M <b>V</b> I <b>A</b> F-
2RH1	203	-----K <b>F</b> -----C <b>L</b> K <b>E</b> H <b>K</b> A <b>L</b> K <b>T</b> L <b>G</b> I <b>M</b> G <b>T</b> F <b>T</b> L <b>C</b> W <b>L</b> <b>F</b> F <b>I</b> V <b>N</b> I <b>V</b> H <b>V</b> I-
2VT4	200	-----I <b>R</b> E <b>H</b> <b>K</b> A <b>L</b> K <b>T</b> L <b>G</b> I <b>M</b> G <b>V</b> F <b>T</b> L <b>C</b> W <b>L</b> <b>F</b> F <b>F</b> L <b>V</b> N <b>I</b> V <b>N</b> V <b>F</b> -
3PBL	189	-----R <b>K</b> G <b>V</b> -----P <b>L</b> R <b>E</b> K <b>K</b> A <b>T</b> Q <b>M</b> V <b>A</b> I <b>V</b> L <b>G</b> A <b>F</b> I <b>V</b> C <b>W</b> L <b>F</b> F <b>F</b> L <b>T</b> H <b>V</b> L <b>N</b> T <b>H</b> -
2YDV	215	-----L <b>Q</b> K <b>E</b> V <b>H</b> A <b>K</b> S <b>L</b> A <b>I</b> I <b>V</b> G <b>L</b> F <b>A</b> L <b>C</b> W <b>L</b> <b>F</b> L <b>H</b> I <b>I</b> N <b>C</b> F <b>T</b> F <b>F</b> -
3V2W	202	-----A <b>S</b> R-----S <b>S</b> E <b>N</b> V <b>A</b> L <b>K</b> T <b>V</b> I <b>I</b> V <b>L</b> S <b>V</b> F <b>I</b> A <b>C</b> W <b>A</b> <b>F</b> L <b>F</b> I <b>L</b> L <b>L</b> L <b>D</b> V <b>G</b> -
3ODU	204	-----G <b>S</b> K-----G <b>H</b> Q <b>K</b> R <b>K</b> A <b>L</b> K <b>T</b> T <b>V</b> I <b>L</b> I <b>L</b> A <b>F</b> F <b>A</b> C <b>W</b> L <b>F</b> <b>Y</b> <b>Y</b> I <b>G</b> I <b>S</b> I <b>D</b> S <b>F</b> I
2I35	245	-----Q <b>K</b> A <b>E</b> K <b>E</b> V <b>T</b> R <b>M</b> V <b>I</b> I <b>M</b> V <b>I</b> A <b>F</b> L <b>I</b> C <b>W</b> L <b>F</b> <b>Y</b> A <b>G</b> V <b>A</b> F <b>Y</b> I <b>F</b> T-
2Z73	239	-----R <b>K</b> A <b>Q</b> A <b>G</b> A <b>N</b> A <b>E</b> -----M <b>R</b> L <b>A</b> K <b>I</b> S <b>I</b> V <b>I</b> V <b>S</b> ----Q <b>F</b> L <b>L</b> S <b>W</b> S <b>F</b> <b>Y</b> A <b>V</b> V <b>A</b> L <b>L</b> A <b>Q</b> F-
TAS2R1	216	-----R <b>V</b> P <b>G</b> -----R <b>G</b> A <b>P</b> I <b>S</b> A <b>L</b> L <b>S</b> I <b>L</b> ----S <b>F</b> L <b>I</b> L <b>Y</b> F <b>S</b> H <b>C</b> M <b>I</b> K <b>V</b> F <b>L</b> S <b>S</b> -
TAS2R3	222	-----R <b>D</b> P <b>T</b> -----T <b>E</b> A <b>H</b> K <b>R</b> A <b>I</b> R <b>I</b> L <b>L</b> ----S <b>F</b> F <b>F</b> L <b>F</b> L <b>Y</b> F <b>L</b> A <b>F</b> L <b>I</b> A <b>S</b> F-
TAS2R4	218	-----W <b>N</b> P <b>Q</b> -----T <b>E</b> A <b>H</b> V <b>G</b> A <b>M</b> K <b>L</b> M <b>V</b> ----Y <b>F</b> L <b>I</b> L <b>Y</b> I <b>F</b> <b>Y</b> S <b>V</b> A <b>T</b> L <b>V</b> Q <b>Y</b> L-
TAS2R5	210	-----R <b>D</b> V <b>R</b> -----A <b>K</b> A <b>H</b> I <b>T</b> A <b>L</b> K <b>S</b> L <b>G</b> ----C <b>F</b> L <b>L</b> L <b>H</b> L <b>V</b> <b>Y</b> I <b>M</b> A <b>S</b> P <b>F</b> S <b>I</b> T-
TAS2R7	223	-----R <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>E</b> A <b>H</b> V <b>R</b> A <b>L</b> K <b>A</b> V <b>I</b> ----S <b>F</b> L <b>L</b> L <b>F</b> I <b>A</b> <b>Y</b> L <b>S</b> F <b>L</b> I <b>A</b> T <b>S</b> -
TAS2R8	223	-----R <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>E</b> V <b>H</b> V <b>R</b> A <b>I</b> K <b>T</b> M <b>T</b> ----S <b>F</b> I <b>F</b> F <b>F</b> L <b>Y</b> <b>Y</b> I <b>S</b> S <b>I</b> L <b>M</b> T <b>F</b> -
TAS2R9	220	-----R <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>E</b> A <b>H</b> M <b>R</b> A <b>I</b> K <b>A</b> V <b>I</b> ----I <b>F</b> L <b>L</b> L <b>L</b> I <b>V</b> <b>Y</b> <b>Y</b> P <b>V</b> F <b>L</b> V <b>M</b> T <b>S</b> -
TAS2R10	215	-----R <b>D</b> S <b>N</b> -----T <b>E</b> A <b>H</b> V <b>K</b> A <b>M</b> K <b>V</b> L <b>I</b> ----S <b>F</b> I <b>I</b> L <b>F</b> I <b>F</b> <b>Y</b> F <b>I</b> G <b>M</b> A <b>I</b> E <b>I</b> S-
TAS2R13	220	-----R <b>D</b> P <b>R</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>N</b> A <b>L</b> K <b>I</b> V <b>I</b> ----S <b>F</b> L <b>L</b> F <b>Y</b> A <b>S</b> F <b>F</b> L <b>C</b> V <b>L</b> I <b>S</b> W <b>I</b> -
TAS2R14	220	-----G <b>D</b> A <b>S</b> -----T <b>K</b> A <b>H</b> R <b>G</b> V- <b>K</b> S <b>V</b> I----T <b>F</b> F <b>L</b> L <b>Y</b> A <b>F</b> S <b>L</b> S <b>F</b> F <b>I</b> S <b>V</b> W-
TAS2R16	215	-----C <b>N</b> P <b>S</b> -----M <b>K</b> A <b>R</b> F <b>T</b> A <b>L</b> R <b>S</b> L <b>A</b> ----V <b>L</b> F <b>I</b> V <b>F</b> T <b>S</b> <b>Y</b> F <b>L</b> T <b>I</b> L <b>I</b> T <b>I</b> I-
TAS2R38	235	-----R <b>D</b> P <b>S</b> -----L <b>E</b> A <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> K <b>S</b> L <b>V</b> ----S <b>F</b> F <b>C</b> F <b>F</b> V <b>I</b> S <b>S</b> C <b>A</b> A <b>F</b> I <b>S</b> V <b>P</b> -
TAS2R39	250	-----N <b>D</b> P <b>S</b> -----M <b>E</b> A <b>H</b> M <b>G</b> A <b>I</b> K <b>A</b> I <b>S</b> ----Y <b>F</b> L <b>I</b> L <b>Y</b> I <b>F</b> N <b>A</b> V <b>A</b> L <b>F</b> I <b>Y</b> L <b>S</b> -
TAS2R40	235	-----R <b>D</b> P <b>S</b> -----M <b>K</b> A <b>H</b> I <b>G</b> A <b>I</b> K <b>A</b> T <b>S</b> ----Y <b>F</b> L <b>I</b> L <b>Y</b> I <b>F</b> N <b>A</b> I <b>A</b> L <b>F</b> L <b>S</b> T <b>S</b> -
TAS2R41	222	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>Q</b> A <b>H</b> T <b>R</b> A <b>L</b> K <b>S</b> L <b>I</b> ----S <b>F</b> L <b>I</b> L <b>Y</b> A <b>L</b> S <b>F</b> L <b>S</b> L <b>I</b> I <b>D</b> A <b>A</b> -
TAS2R43	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>I</b> ----S <b>F</b> L <b>L</b> L <b>C</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>L</b> S <b>I</b> M <b>I</b> S <b>V</b> W-
TAS2R44	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>I</b> ----F <b>F</b> L <b>L</b> L <b>C</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>L</b> S <b>I</b> M <b>I</b> S <b>V</b> W-
TAS2R45	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> V <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>I</b> ----S <b>F</b> F <b>L</b> L <b>R</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>V</b> S <b>V</b> I <b>I</b> S <b>V</b> W-
TAS2R46	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----M <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>T</b> ----S <b>F</b> L <b>L</b> L <b>C</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>L</b> S <b>I</b> I <b>M</b> S <b>V</b> W-
TAS2R47	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>T</b> ----S <b>F</b> L <b>L</b> L <b>C</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>L</b> S <b>M</b> I <b>I</b> S <b>V</b> C-
TAS2R48	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>T</b> ----S <b>F</b> L <b>M</b> L <b>F</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>L</b> C <b>I</b> I <b>T</b> S <b>T</b> W-
TAS2R49	217	-----Q <b>D</b> P <b>S</b> -----T <b>K</b> I <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> V <b>T</b> ----S <b>F</b> L <b>I</b> L <b>L</b> A <b>I</b> <b>Y</b> F <b>L</b> C <b>L</b> I <b>I</b> S <b>F</b> W-
TAS2R50	217	-----Q <b>D</b> L <b>S</b> -----T <b>K</b> V <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> Q <b>T</b> L <b>I</b> ----S <b>F</b> L <b>L</b> L <b>C</b> A <b>I</b> <b>F</b> F <b>L</b> F <b>L</b> I <b>V</b> S <b>V</b> W-
TAS2R55	222	-----R <b>D</b> S <b>S</b> -----T <b>E</b> A <b>H</b> R <b>R</b> A <b>M</b> K <b>M</b> V <b>M</b> ----S <b>F</b> L <b>F</b> L <b>F</b> I <b>V</b> H <b>F</b> F <b>S</b> L <b>Q</b> V <b>A</b> N <b>G</b> -
TAS2R56	235	-----R <b>E</b> P <b>S</b> -----V <b>Q</b> A <b>H</b> I <b>K</b> A <b>L</b> L <b>A</b> L <b>L</b> ----S <b>F</b> A <b>M</b> L <b>F</b> I <b>S</b> <b>Y</b> F <b>L</b> S <b>L</b> V <b>F</b> S <b>A</b> A-

7.50

↓

3UON 235 -----CAPCI---PNTVWTIGYWLCYINSTINACACYALCNATFKKTFKHLLM-----  
 4DAJ 228 -----CDSCI---PKTYWNLGYWLCYINSTVNVVCYALCNKTFRTTFKT-----  
 3RZE 224 -----CKNCC---NEHLHMFTIWLGYINSTLNFLIYPLCNENFKKTFKRILHI-----  
 2RH1 239 -----QDNLI---RKEVYILLNWIGYVNSGFNLIYIC-RSPDFRIAFQELLCLE-----  
 2VT4 233 -----NRDLV---PDWLFVAFNWLGYANSAMNLIYIC-RSPDFRKAFLKLLAF-----  
 3PBL 227 -----CQTCHV---SPELYSATTWLGYNVNSALNVIYTTFNIEFRKAFKILSC-----  
 2YDV 249 -----CPDCSH-APLWLMYLAIVLSHTNSVNVNFIYAYRIREFRQTFRKIIIRSHVLRQQ  
 3V2W 239 -----CKVKTCD---ILFRAEYFLVLAVLNSGTNLIYTLTNKEMRRAFIRI-----  
 3ODU 242 LLEIIKQGEFENTVHKWISITEALAFFHCCLNLIYAFLGAKFKTSAQHALLTSGRPLEV  
 2I35 279 -----HQGSDF---GPIFMTIPAFFAKTSAVYNVIYIMMNKQFRNCMVTTLCCKGNDDE  
 2Z73 279 -----GPLEWV---TPYAAQLPVMFAKASAIHNMIIYSVSHPKFREAIQTFFPWLTCQ  
 TAS2R1 250 -----LKFHI---RRFIFLFFILVIGIYPSGHSLLILILGNPKLQNAKFFLLHKKCCQ-  
 TAS2R3 256 -----GNFLPK---TKMAKMI GEVMTMFYPAGHSFILLILGNPKLQTFVVMRLCESGHLK  
 TAS2R4 252 -----PFYAGM---DMGTKSICLIFATLYSPGHSVLIITHTPKLTTAKKILCFKK----  
 TAS2R5 244 -----SKTYPP---DLTSVFIWETLMAAYPSLHSLILIMGIPRVKQTCQKILWKTVCARR  
 TAS2R7 257 -----SYFMPE---TELAVIFGESIALIYPSHSHFILLILGNPKLRHASLKVIVKVMISILK  
 TAS2R8 257 -----SYLMTK---YKLAVEFGEIAAILYPLGHSLLILIVLNNKLRQTFVRLMTCRKIACM  
 TAS2R9 254 -----SALIPQ---GKLVLMIGDIVTVIFPSSHSHFILLIMGNPKLREAFKMLRFVKCFLR  
 TAS2R10 249 -----CFTVRE---NKL LLMFGMTTITAIYPWGHSHFILLILGNPKLQASLRVLQQLKCCCK  
 TAS2R13 254 -----SELYQ---NTVIYMLCETIGVFSPPSSHSHFLLILGNPKLRQAFLLVAAKVWAKR-  
 TAS2R14 253 -----TSERL---EENLII LSQVMGMAYPSCHSHCVLILGNPKLRQASLSVLLWLRVMFK  
 TAS2R16 249 -----GTLFD---KRCWLWVWEAFVYAFILMHSTSLM LSSPTLKRILKGC-----  
 TAS2R38 269 -----LLILWR---DKIGVMVVCVGI MAACP SGHAA ILISGNAKLRRAVMTILLWAQSSLK  
 TAS2R39 284 -----NMFDI---NSLWNNLCQI IMAAYPASHSILLIQDNPGLRRRAWKRLQLRLHLYPK  
 TAS2R40 269 -----NIFDT---YSSWNILCKI IMAAYPAGHSVQLILGNPGLRRRAWKRFQHQVPLYLK  
 TAS2R41 256 -----KFISM---QNDFYWPQIAVYLCISVHPFILLIFSNLKLRSVFSQLLLLLARGFWV  
 TAS2R43 251 -----SFGSLE---NKPVFMFCKAIRFSYPSIHPFILLIWGNKCLKKQTFLSVFWQMRYWVK  
 TAS2R44 251 -----SFGSLE---NKPVFMFCKAIRFSYPSIHPFILLIWGNKCLKKQTFLSVLRQVRYWVK  
 TAS2R45 251 -----SFKNLE---NKPVFMFCQAIGFSCSSAHPFILLIWGNKCLKKQTYLSVLWQMRY---  
 TAS2R46 251 -----SFESLE---NKPVFMFCEAIAFSYPSTHPFILLIWGNKCLKKQTFLSVLWHVRYWVK  
 TAS2R47 251 -----NLGRLE---KQPVFMFCQAIIFSYPSTHPFILLILGNKCLKKQIFLSVLRHVRYWVK  
 TAS2R48 251 -----NLRTQQ---SKLVLLLCQTVAIMYPSFHSFILLIMGSRKCLKKQTFLSVLWQMTR---  
 TAS2R49 251 -----NFKMRP---KEIVLMLCQAFGIIYPSFHSFILLIWGNKTLKQTFLSVLWQVTCWAK  
 TAS2R50 251 -----SPRRLR---NDPVVMVSKAVGNIYLAFD SFILLIWRKCLKKHTFLILLCQIRC---  
 TAS2R55 256 -----IFFMLW---NNKYIKFVMLALNAFPSCHSHFILLILGNPKLRQTA VRLLWHLRNYTK  
 TAS2R56 269 -----GIFPP---LDFKFWVWESVIYLCAAVHP IILLFSNCLRAVLKSRSS-RCGTP

---

3UON		-----
4DAJ		-----
3RZE		-----
2RH1		-----
2VT4		-----
3PBL		-----
2YDV	302	EPF-----KAAAAENLYFQ-----
3V2W		-----
3ODU	302	LFQ-----
2I35	331	-----
2Z73	331	FDD-----KETEDDKDAETEIPAGE
TAS2R1		-----
TAS2R3	308	PGS-----KGPIFS-----
TAS2R4		-----
TAS2R5	296	CWGP-----
TAS2R7	309	GRK-----FQQHKQI-----
TAS2R8	309	I-----
TAS2R9	306	RRK-----PFVP-----
TAS2R10	301	RKN-----LRVT-----
TAS2R13		-----
TAS2R14	304	DGE-----PSGHKEFRESS-----
TAS2R16		-----
TAS2R38	321	VRA-----DHKADSR TLC-----
TAS2R39	335	EWTL-----
TAS2R40	320	GQTL-----
TAS2R41	307	A-----
TAS2R43	303	GEK-----TSSP-----
TAS2R44	303	GEK-----PSSP-----
TAS2R45		-----
TAS2R46	303	GEK-----PSSS-----
TAS2R47	303	DRSLRLHRFTRAALCKG-----
TAS2R48		-----
TAS2R49	303	GQN-----QSTP-----
TAS2R50		-----
TAS2R55	308	TPN-----ALPL-----
TAS2R56	319	-----

## 10.9 Funktionsanalysen mit erweitertem Testsubstanzen-Set

Tabelle 12: Funktionelle Charakterisierung der punktmutierten TAS2R14 Rezeptorvarianten

Bei der funktionellen Charakterisierung mit den TAS2R14-Agonisten wurden die Schwellenwerte (TH), die EC<sub>50</sub>-Werte (n.d. = EC<sub>50</sub>-Wert nicht bestimmbar) und die Signalamplitude bei der höchsten gemessenen Konzentration (max.A. = maximale Aktivierung) dargestellt.

TAS2R14-Konstrukt	Flufenaminsäure			Genistein		
	TH [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]	max. A. bei 10μM [%]	TH [μM]	EC <sub>50</sub> [μM]	max. A. bei 30 μM [%]
Wildtyp	0,01	0,08 ± 0,01	100	1,0	3,95 ± 0,17	100
W66A	0,10	0,73 ± 0,03	110	10,0	n.d.	59
W66F	0,01	0,10 ± 0,03	91	10,0	10,24 ± 0,52	80
L85A	0,03	0,21 ± 0,02	128	3,0	7,00 ± 0,35	96
T86A	0,01	0,21 ± 0,02	82	10,0	14,02 ± 0,79	47
T86S	0,01	0,10 ± 0,03	108	3,0	5,00 ± 0,37	75
T86V	0,01	0,12 ± 0,02	91	10,0	11,84 ± 0,61	53
T86I	0,01	0,07 ± 0,01	91	3,0	6,52 ± 0,39	83
N87A	0,10	1,27 ± 0,07	88	10,0	n.d.	29
W89A	0,10	0,70 ± 0,02	101	-	n.d.	-
W89F	0,01	0,17 ± 0,01	93	1,0	3,09 ± 0,49	77
W89Y	0,01	0,17 ± 0,03	99	1,0	3,20 ± 0,38	59
T90A	0,01	0,04 ± 0,01	94	1,0	4,76 ± 0,15	89
T90I	0,01	0,13 ± 0,02	102	1,0	3,15 ± 0,32	108
N93A	1,00	1,07 ± 0,05	92	-	n.d.	-
N93Q	0,03	0,48 ± 0,01	124	3,0	4,16 ± 0,22	107
H94A	0,03	0,33 ± 0,01	130	30,0	n.d.	61
H94E	1,00	n.d.	20	-	n.d.	-
T182A	0,01	0,17 ± 0,02	125	3,0	28,06 ± 6,38	57
S183A	0,01	0,04 ± 0,01	107	3,0	9,38 ± 0,14	75
F186A	0,03	0,16 ± 0,01	91	10,0	23,52 ± 5,10	64
F186Y	1,00	1,73 ± 0,20	67	30,0	n.d.	30
F186L	1,00	n.d.	41	30,0	n.d.	19
I187A	0,03	0,04 ± 0,01	96	1,0	3,34 ± 0,05	68
I187L	0,03	0,17 ± 0,02	108	1,0	4,97 ± 0,25	84
I187V	0,01	0,05 ± 0,01	106	1,0	4,45 ± 0,35	82
Y240A	1,00	n.d.	45	10,0	n.d.	55
Y240F	0,03	0,33 ± 0,02	74	10,0	15,05 ± 1,41	50
A241I	0,01	0,12 ± 0,02	92	30,0	n.d.	29
F243A	0,01	0,08 ± 0,01	93	1,0	3,80 ± 0,20	96
F243Y	0,03	0,32 ± 0,05	85	3,0	9,94 ± 0,21	99
F247A	1,00	1,25 ± 0,08	75	10,0	n.d.	44
F247Y	0,01	0,17 ± 0,02	84	3,0	4,64 ± 0,15	98
F247V	0,03	0,30 ± 0,11	56	3,0	5,79 ± 0,17	88
I263A	0,01	0,33 ± 0,05	86	10,0	n.d.	42
Q266A	0,01	0,04 ± 0,01	96	1,0	2,65 ± 0,27	105
Q266E	0,10	0,45 ± 0,03	92	3,0	4,54 ± 0,06	75
Q266N	0,10	0,47 ± 0,03	103	1,0	5,16 ± 0,17	141
Q266L	0,01	0,15 ± 0,02	112	1,0	5,12 ± 0,16	115
G269A	0,01	0,07 ± 0,01	106	1,0	3,31 ± 0,12	55
G269I	10,00	n.d.	28	30,0	n.d.	16



Beschreibung siehe: Tabelle 12

TAS2R14-Konstrukt	Santonin			Parthenolid		
	TH [ $\mu\text{M}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	max. A.bei 300 $\mu\text{M}$ [%]	TH [ $\mu\text{M}$ ]	EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	max. A.bei 100 $\mu\text{M}$ [%]
TAS2R14 wt	3,0	9,03 $\pm$ 0,62	100	1,0	10,27 $\pm$ 0,25	100
W66A	10,0	48,04 $\pm$ 1,91	133	3,0	15,64 $\pm$ 1,09	157
W66F	3,0	11,36 $\pm$ 0,61	77	1,0	8,18 $\pm$ 0,19	81
L85A	30,0	65,02 $\pm$ 3,45	94	3,0	n.d.	51
T86A	3,0	13,48 $\pm$ 0,85	130	0,3	3,99 $\pm$ 0,14	116
T86S	1,0	3,22 $\pm$ 0,31	108	0,3	1,86 $\pm$ 0,05	121
T86V	30,0	88,71 $\pm$ 4,43	68	3,0	37,92 $\pm$ 1,98	59
T86I	100,0	153,49 $\pm$ 14,95	93	10,0	n.d.	36
N87A	10,0	44,53 $\pm$ 3,79	132	10,0	46,35 $\pm$ 6,81	77
W89A	100,0	n.d.	78	-	n.d.	-
W89F	30,0	94,96 $\pm$ 5,57	86	3,0	14,35 $\pm$ 0,73	146
W89Y	30,0	n.d.	39	3,0	13,84 $\pm$ 0,80	103
T90A	3,0	16,37 $\pm$ 2,56	104	3,0	16,54 $\pm$ 3,20	51
T90I	10,0	29,93 $\pm$ 2,03	120	3,0	19,51 $\pm$ 0,81	83
N93A	10,0	54,46 $\pm$ 2,39	127	10,0	29,27 $\pm$ 1,05	126
N93Q	10,0	35,88 $\pm$ 1,46	135	30,0	n.d.	56
H94A	10,0	44,96 $\pm$ 2,89	192	10,0	53,48 $\pm$ 4,83	129
H94E	30,0	85,93 $\pm$ 10,12	40	30,0	n.d.	18
T182A	3,0	12,00 $\pm$ 2,91	86	3,0	21,53 $\pm$ 1,03	101
S183A	10,0	28,37 $\pm$ 0,86	75	3,0	13,83 $\pm$ 1,61	68
F186A	10,0	51,06 $\pm$ 1,08	99	3,0	7,70 $\pm$ 0,52	98
F186Y	10,0	66,42 $\pm$ 4,58	88	3,0	82,30 $\pm$ 68,92	49
F186L	10,0	78,41 $\pm$ 7,23	88	30,0	334,65 $\pm$ 138,41	48
I187A	30,0	n.d.	41	10,0	20,09 $\pm$ 7,22	41
I187L	10,0	20,66 $\pm$ 2,11	80	10,0	18,92 $\pm$ 1,25	71
I187V	3,0	9,53 $\pm$ 0,67	75	10,0	19,33 $\pm$ 3,43	19
Y240A	3,0	11,66 $\pm$ 2,15	55	3,0	14,31 $\pm$ 0,79	76
Y240F	3,0	12,16 $\pm$ 1,37	77	3,0	12,27 $\pm$ 1,07	79
A241I	10,0	13,76 $\pm$ 1,23	62	3,0	14,76 $\pm$ 0,26	81
F243A	10,0	13,91 $\pm$ 1,97	70	10,0	23,61 $\pm$ 1,25	63
F243Y	3,0	14,39 $\pm$ 1,52	113	3,0	13,39 $\pm$ 0,50	103
F247A	10,0	48,62 $\pm$ 8,32	86	1,0	9,68 $\pm$ 0,37	120
F247Y	-	n.d.	-	-	n.d.	-
F247V	3,0	11,11 $\pm$ 0,10	98	3,0	9,05 $\pm$ 1,17	121
I263A	10,0	21,39 $\pm$ 1,79	80	1,0	7,61 $\pm$ 0,41	107
Q266A	30,0	73,06 $\pm$ 4,60	101	0,3	8,54 $\pm$ 0,61	172
Q266E	30,0	68,23 $\pm$ 5,64	85	10,0	21,89 $\pm$ 9,37	30
Q266N	30,0	154,42 $\pm$ 31,84	64	30,0	n.d.	35
Q266L	30,0	75,02 $\pm$ 3,20	144	30,0	n.d.	47
G269A	10,0	32,25 $\pm$ 0,32	96	3,0	101,52 $\pm$ 77,41	53
G269I	10,0	31,08 $\pm$ 0,86	200	30,0	n.d.	38

## 10.10 Expression und Lokalisation der punktmutierten Rezeptoren TAS2R14

Die Abbildung 51 bis Abbildung 60 zeigen die Expression und die berechnete Expressionseffizienz der verschiedenen Fusionsproteine wie in Abschnitt 2.5. beschrieben.

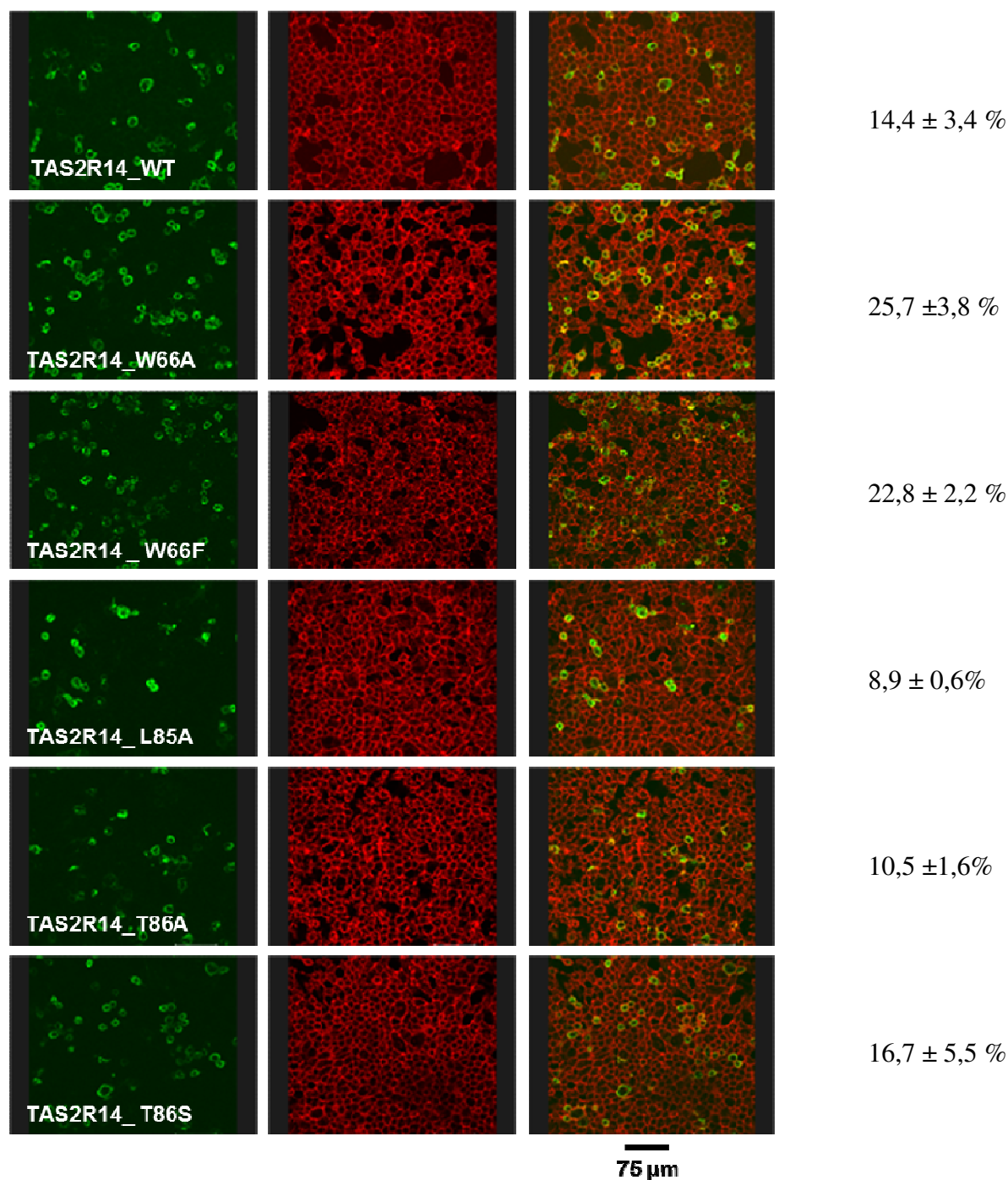


Abbildung 51: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil I)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

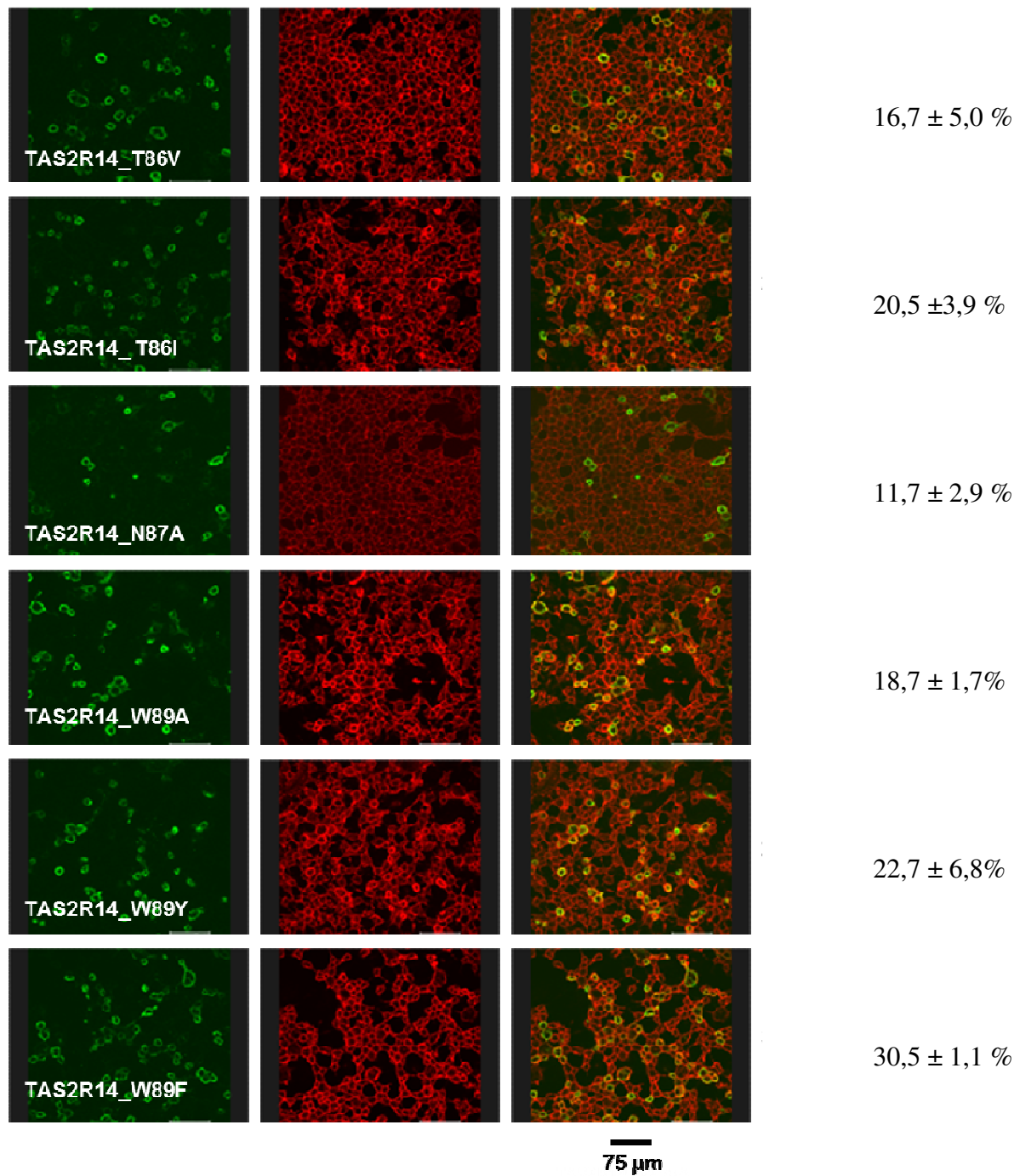


Abbildung 52: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil II)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

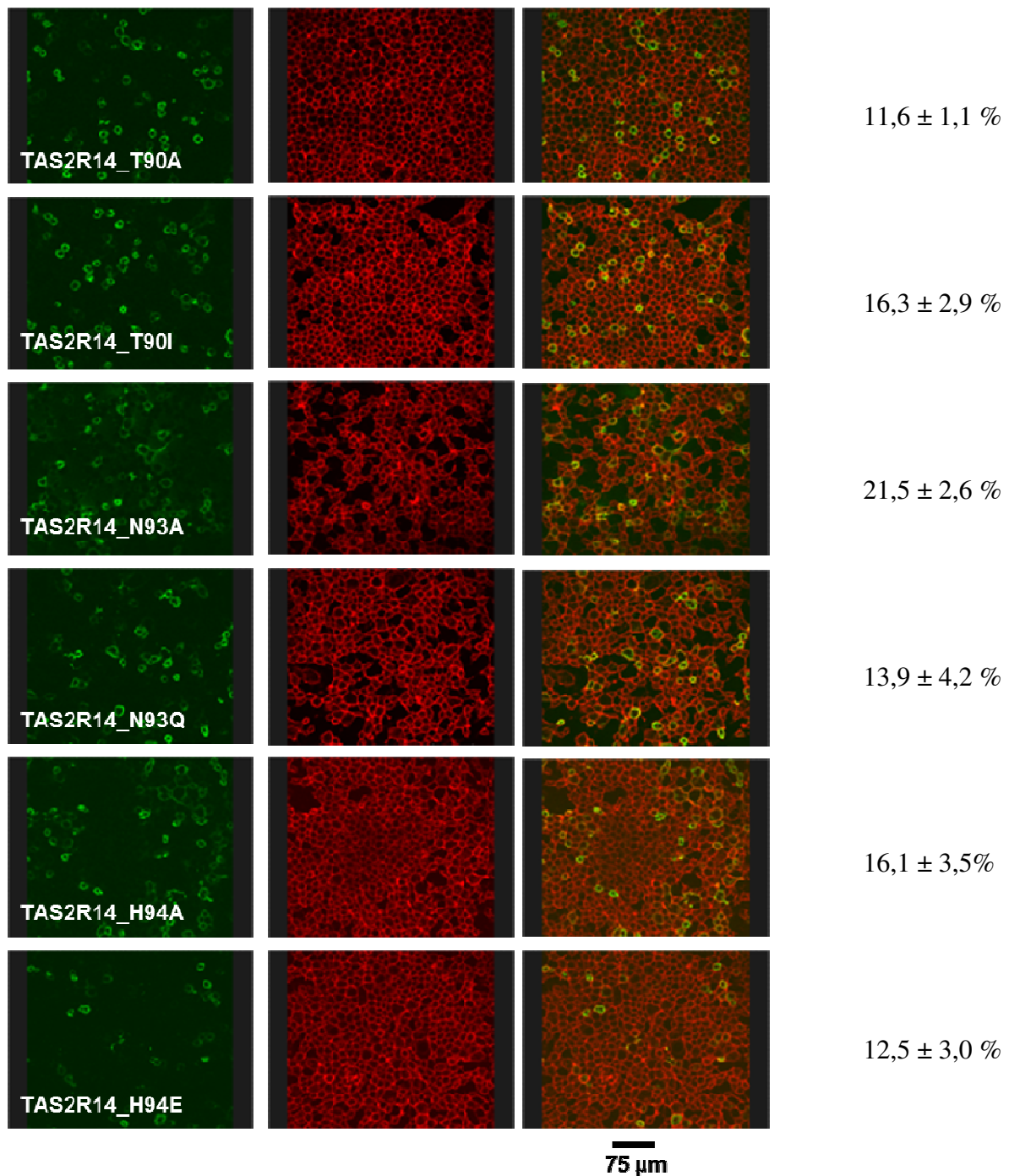


Abbildung 53: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil III)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

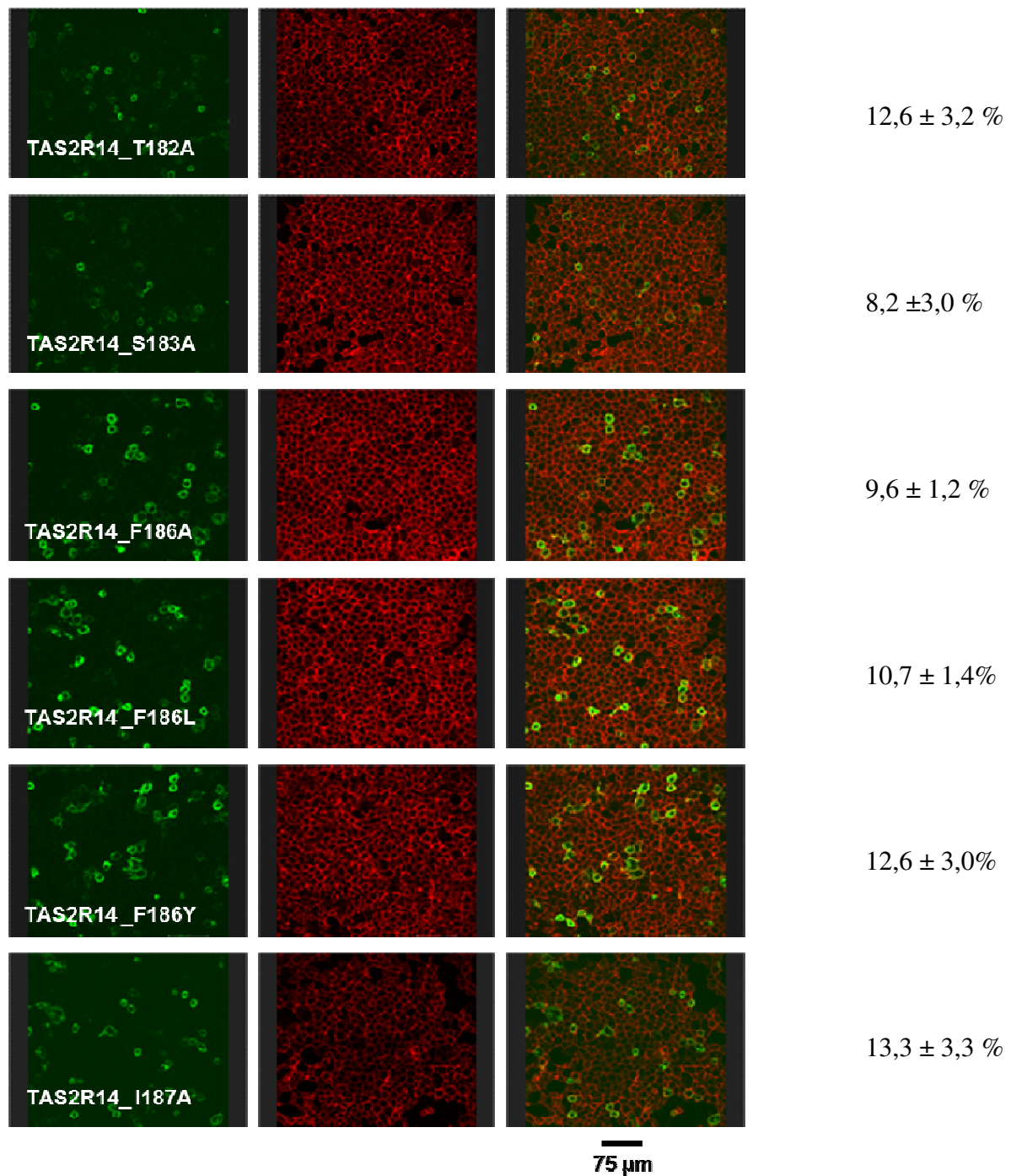


Abbildung 54: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil IV)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

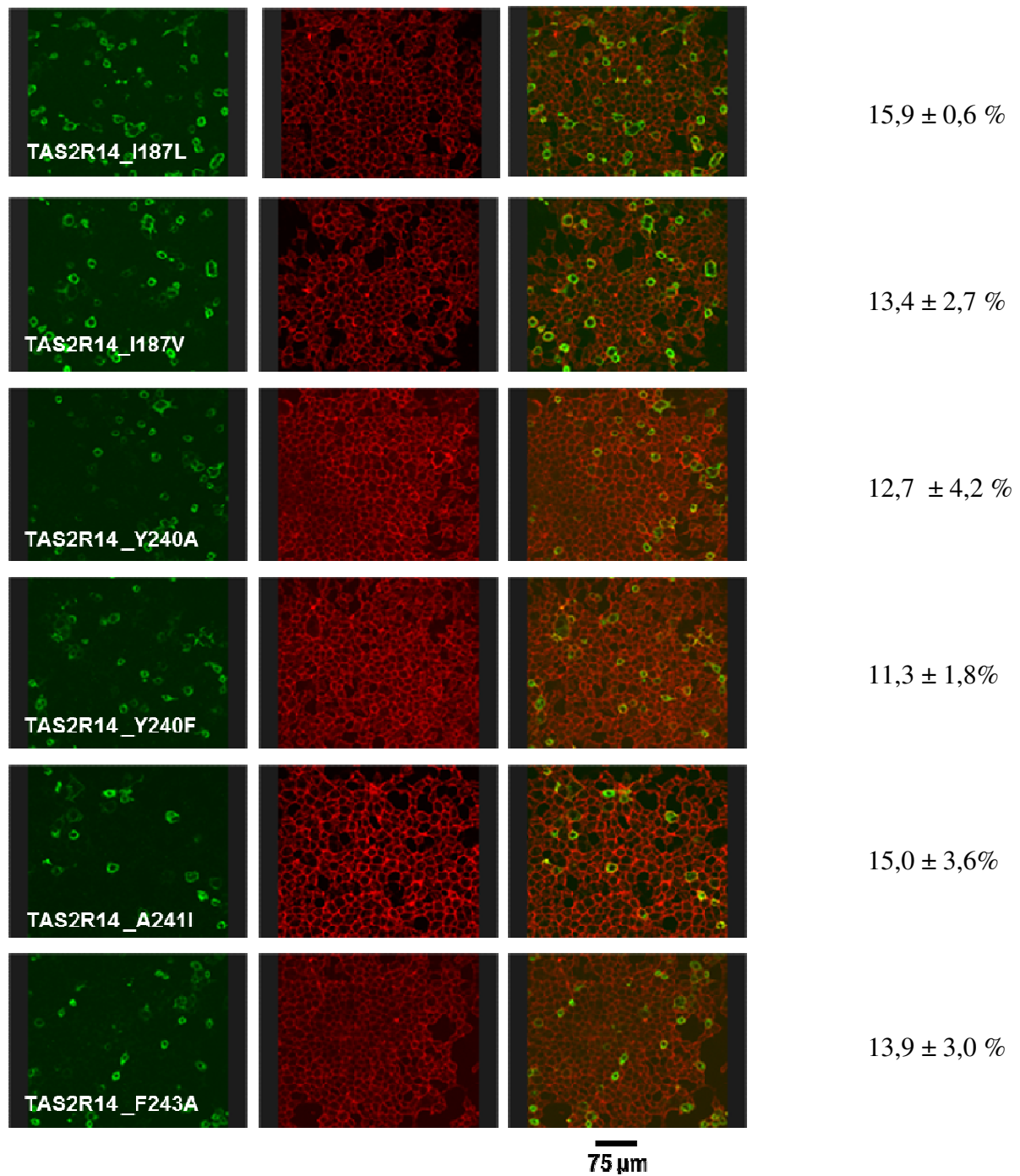


Abbildung 55: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil V)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

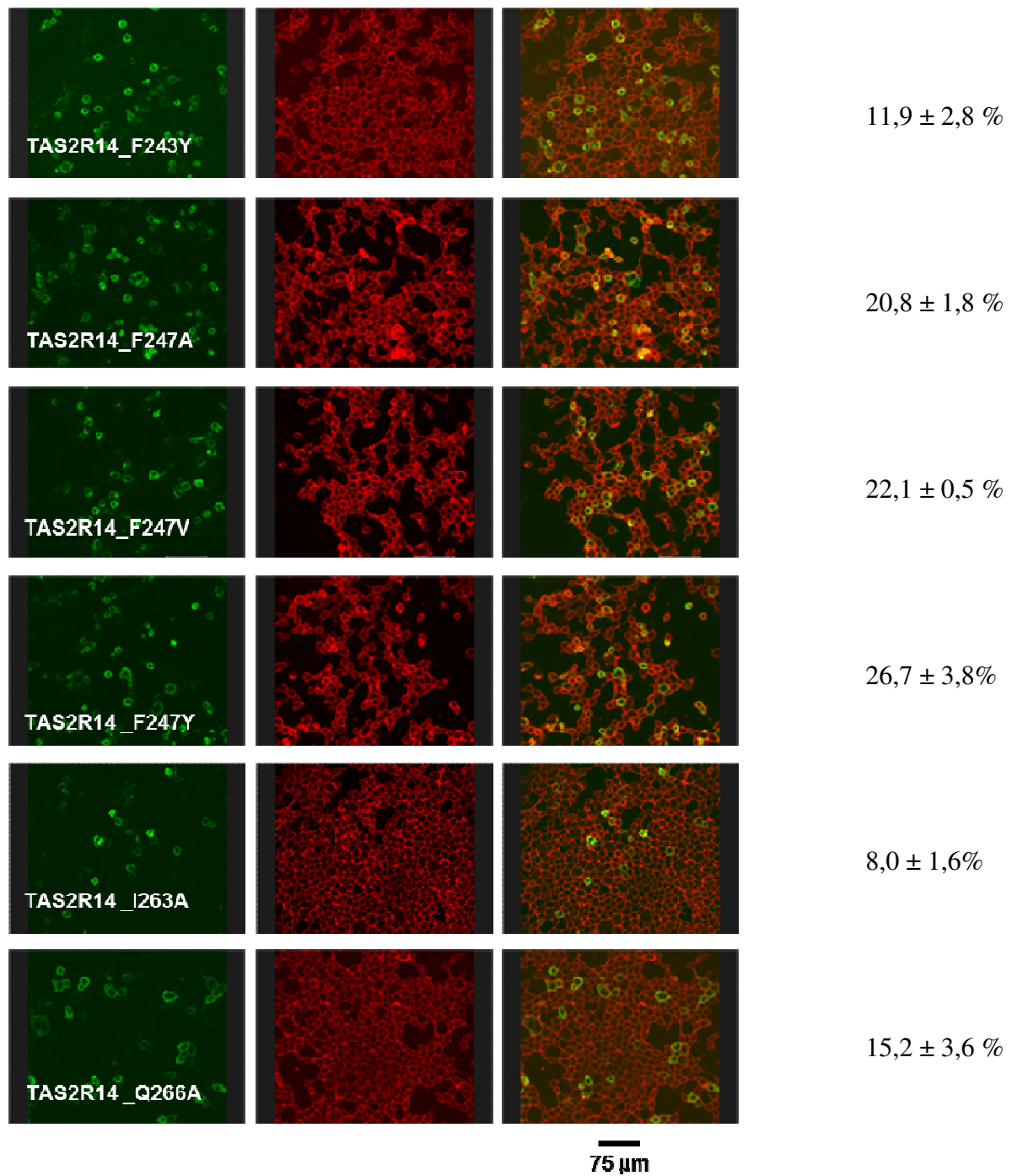


Abbildung 56: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil VI)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

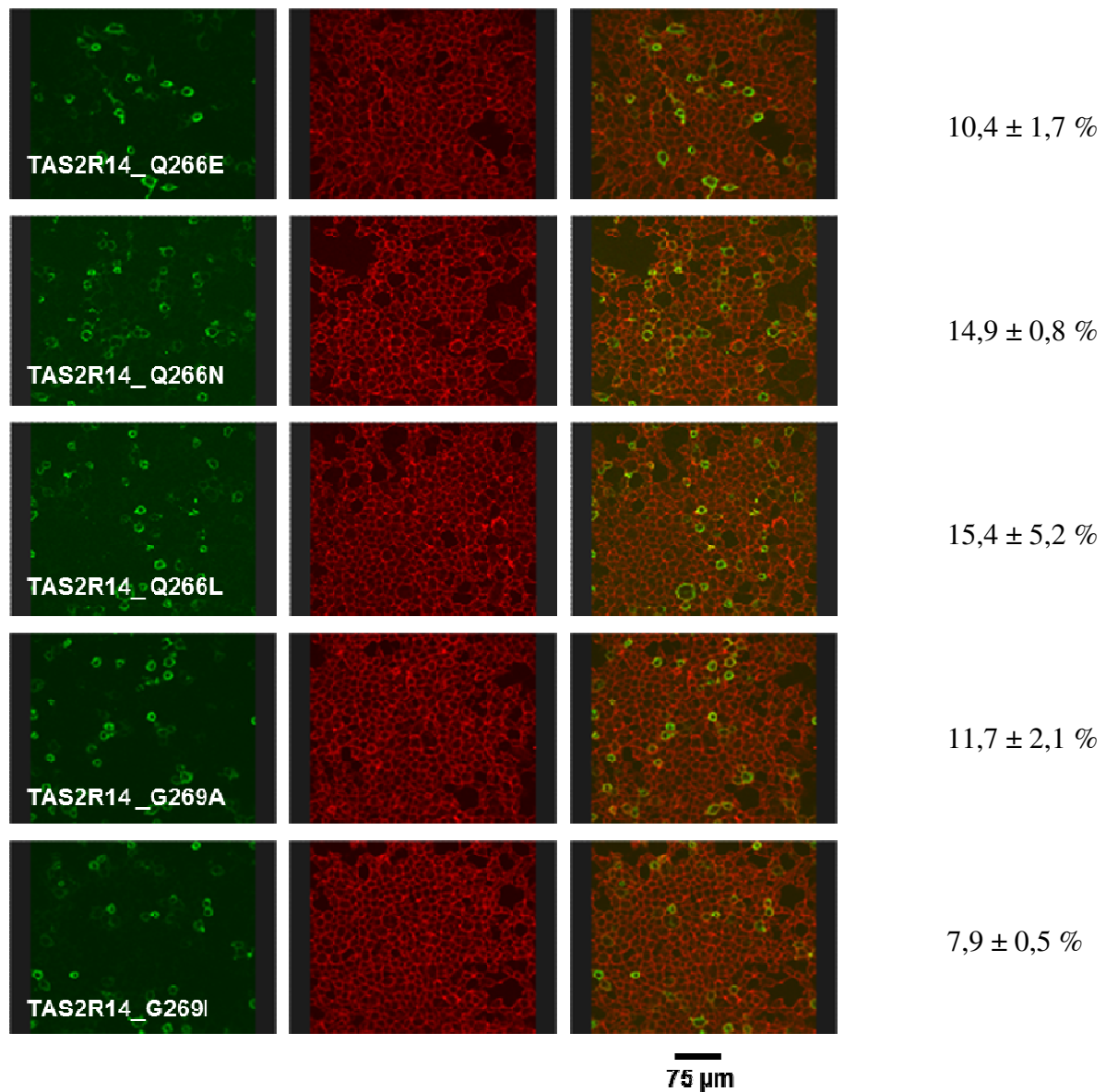


Abbildung 57: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil VII)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.



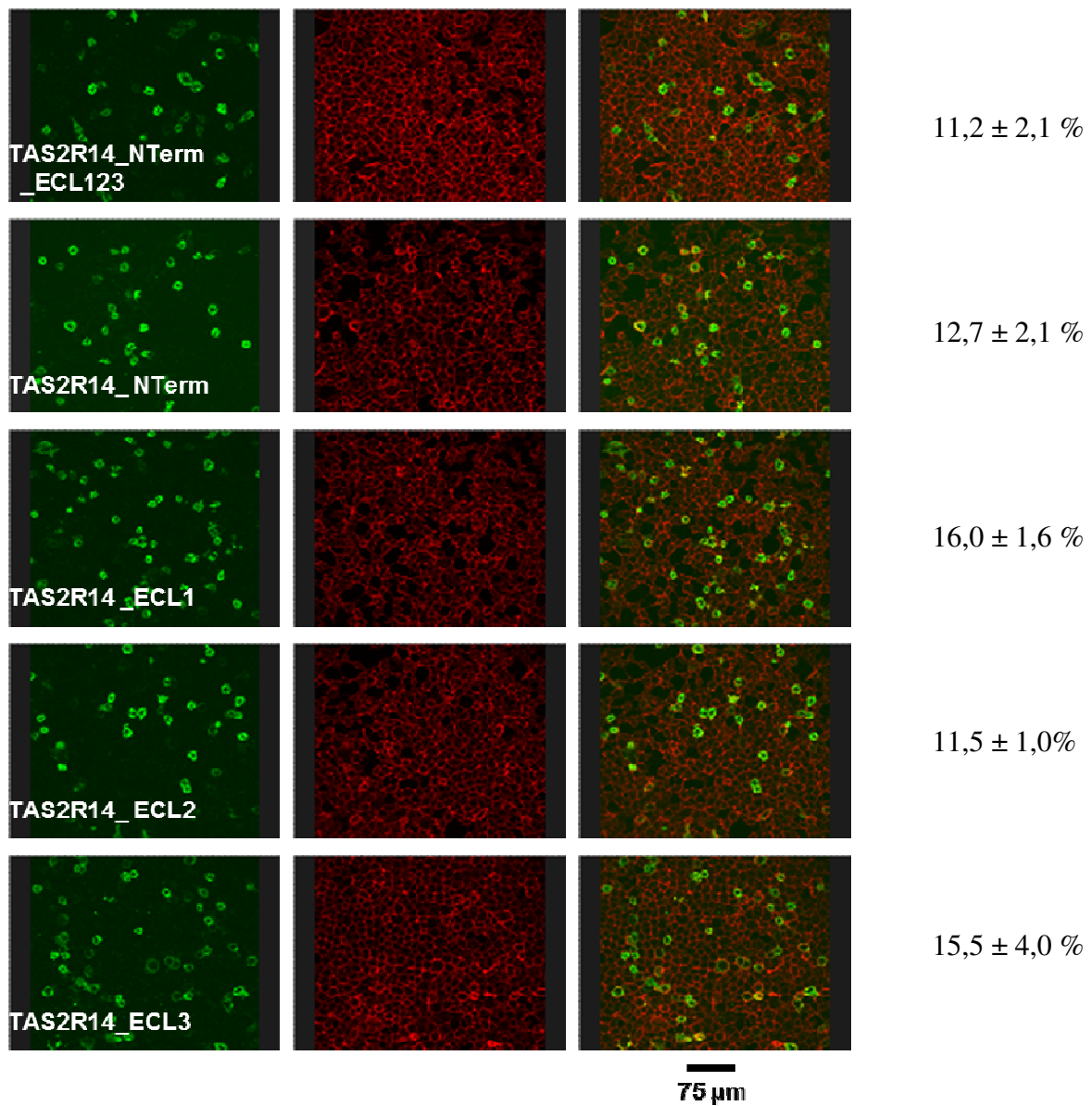


Abbildung 58: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil VIII)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

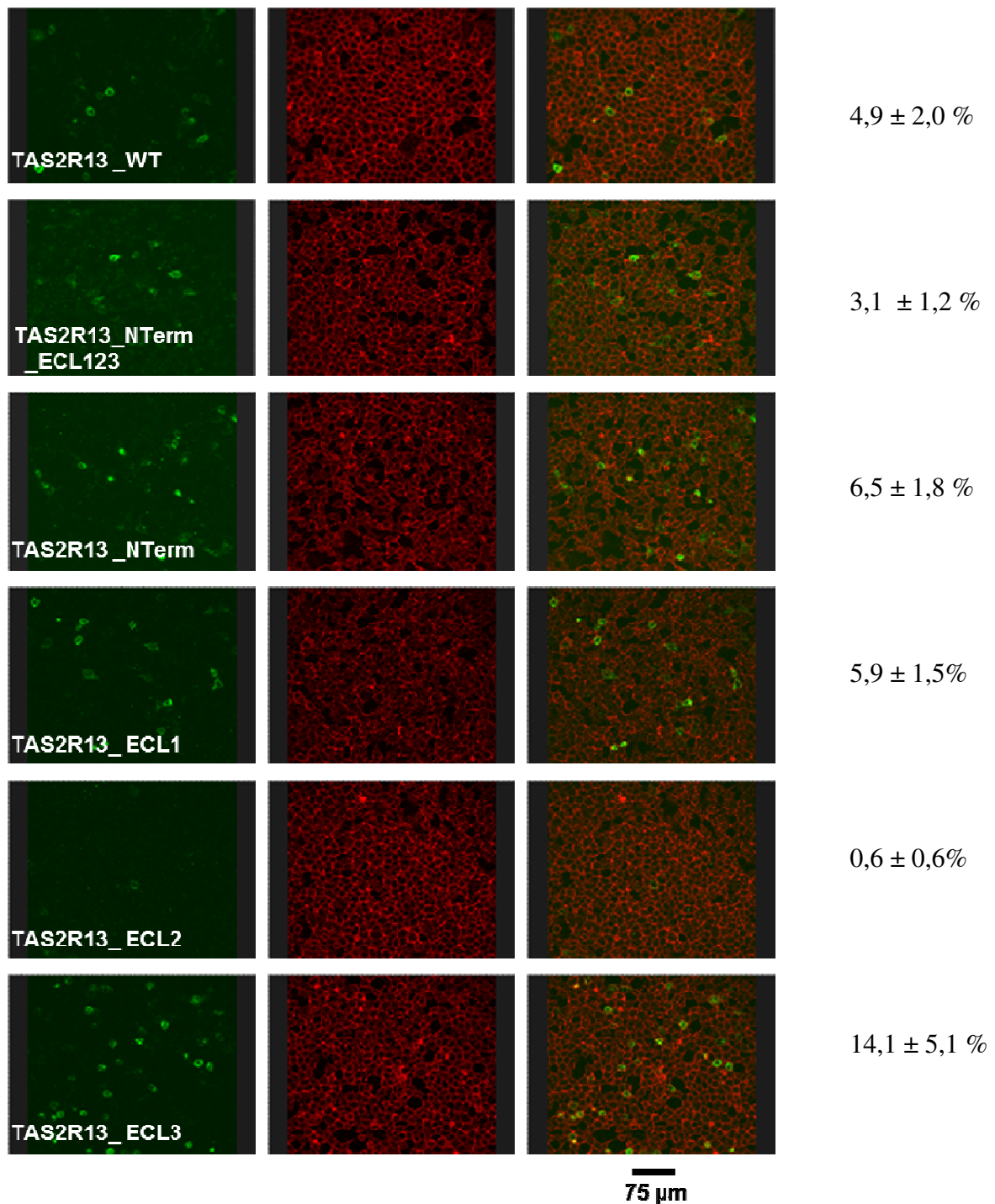


Abbildung 59: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil IX)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

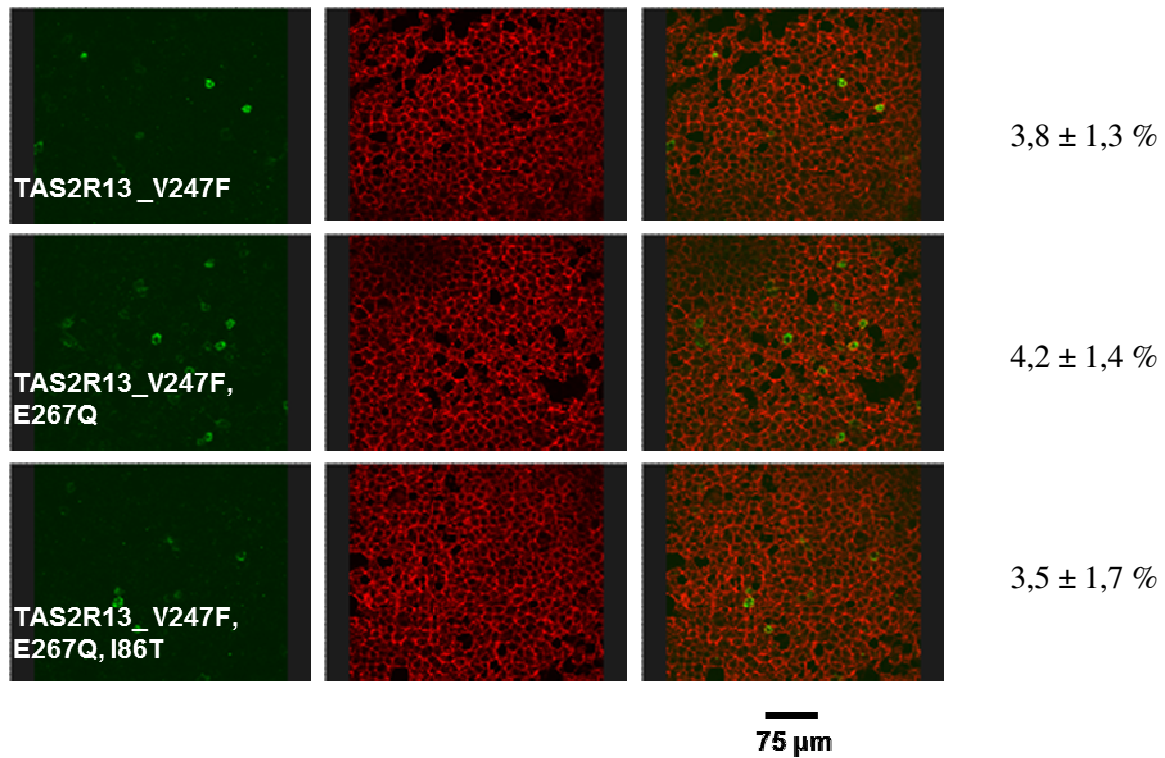


Abbildung 60: Immunzytologische Expressionsnachweis (Teil X)

Die linken Aufnahmen zeigen die Rezeptor-Detektion mittels immunzytologischem Nachweis des HSV-Tag (grün, ~488). In der Mitte sind die Aufnahmen der Zellmembran-Anfärbung durch Con-A-Markierung mit Streptavidin-Antikörper-Detektion (rot, ~633) dargestellt. Rechts sind die überlagerten Bilder beider Aufnahmen gezeigt und die Expressionseffizienz mit Standardabweichung der jeweiligen Rezeptorvariante.

## 10.11 Publierte Kristallstrukturanalysen von GPCRs

Tabelle 13: Ausschnitt aus publizierten Kristallstrukturuntersuchungen

Dargestellt sind die untersuchten Rezeptoren mit der Angabe der Familie, die untersuchte Spezies des Rezeptors und die Referenz. Ein Überblick über alle 25 publizierten Kristallstrukturuntersuchungen und deren Gruppierung ist auf der Homepage: <http://gpcr.use.edu/> zu finden.

Rezeptor	Familie	Spezies	Referenz
Glucagon	Secretin	Mensch	(Runge et al., 2008; Underwood et al., 2010)
Corticotropin-releasing factor 1 Rezeptor (CRF1R)	Secretin	Mensch	(Pioszak et al., 2008)
Glutamt GluR1	Glutamat	Maus	(Dingledine et al., 1999)
Glutamt GluR2	Glutamat	Maus	(Armstrong et al., 2000)
Smoothened (SMOH)	Glutamat	Mensch	(Wang et al., 2013)
Neurotensin (NTSR1)	Rhodopsin	Ratte	(White et al., 2012)
A2A-Adenosin Rezeptor	Rhodopsin	Mensch	(Lebon et al., 2011)
Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor (S1P1)	Rhodopsin	Mensch	(Hanson et al., 2012)
$\beta$ 1-adrenerger Rezeptor (ADR $\beta$ 1)	Rhodopsin	Mensch	(Serrano-Vega et al., 2008; Warne et al., 2008)
$\beta$ 2-adrenerger Rezeptor (ADR $\beta$ 2)	Rhodopsin	Mensch / Truthahn	(Cherezov et al., 2007; Rasmussen et al., 2007; Rasmussen et al., 2011)
Serotonin-Rezeptor 5-HT 1B	Rhodopsin	Mensch	(Wacker et al., 2013)
Serotonin-Rezeptor 5-HT 2B	Rhodopsin	Mensch	(Wacker et al., 2013)
Dopamin D3	Rhodopsin	Mensch	(Chien et al., 2010)
M2 Muscarinic Rezeptor (CHRM2)	Rhodopsin	Mensch	(Haga et al., 2012)
M3 Muscarinic acetylcholin Rezeptor (CHRM3)	Rhodopsin	Mensch / Ratte	(Haga et al., 2012; Kruse et al., 2012)
Purinorezeptor P2Y12	Rhodopsin	Mensch	(Zhang et al., 2014)
Protease-activated (PAR1)	Rhodopsin	Mensch	(Zhang et al., 2012)
Histamin H1	Rhodopsin	Mensch	(Shimamura et al., 2011)
Nociceptin	Rhodopsin	Mensch	(Thompson et al., 2012)
Kappa-Opioid	Rhodopsin	Mensch	(Wu et al., 2012)
Chemokin CXCR4	Rhodopsin	Mensch	(Qin et al., 2015)
C-C-Chemokin Rezeptor 5 (CCR5)	Rhodopsin	Mensch	(Wu et al., 2010)
Rhodopsin	Rhodopsin	Rind/ Tinten- fisch	(Murakami et al., 2008; Palczewski et al., 2000; Salom et al., 2006)

## 10.12 Eigenschaften der Aminosäuren

Tabelle 14: Aminosäuren mit Angaben des 3 bzw. 1 Buchstaben Code und der Tripletts

Aminosäure	3 Buchstaben Code	1 Buchstaben Code	Tripletts
Alanin	Ala	A	GCA;GCT;GCC;GCG
Cystein	Cys	C	TGC;TGT
Asparaginsäure	Asp	D	GAT;GAC
Glutaminsäure	Glu	E	GAA;GAG
Phenylalanin	Phe	F	TTC;TTT
Glycin	Gly	G	GGA;GGC;GGG;GGT;
Histidin	His	H	CAC;CAT
Isoleucin	Ile	I	ATA;ATC;ATT
Lysine	Lys	K	AAA,AAG,
Leucin	Leu	L	CTA;CTC;CTG;CTT;TTA;TTG
Methionin	Met	M	ATG
Asparagin	Asn	N	AAC,AAT
Stop Codon	END	Ter	TAA;TAG;TGA;
Prolin	Pro	P	CCA;CCC;CCG;CCT
Glutamin	Gln	Q	CAA;CAG;
Arginin	Arg	R	AGA;AGG;CGA;CGC;CGG;CGT
Serin	Ser	S	AGC;AGT;TCA;TCC;TCG;TCT
Threonin	Thr	T	ACA;ACC;ACG;ACT
Valin	Val	V	GTA;GTC;GTG;GTT
Tryptophan	Trp	W	TGG
Tyrosin	Tyr	Y	TAC;TAT

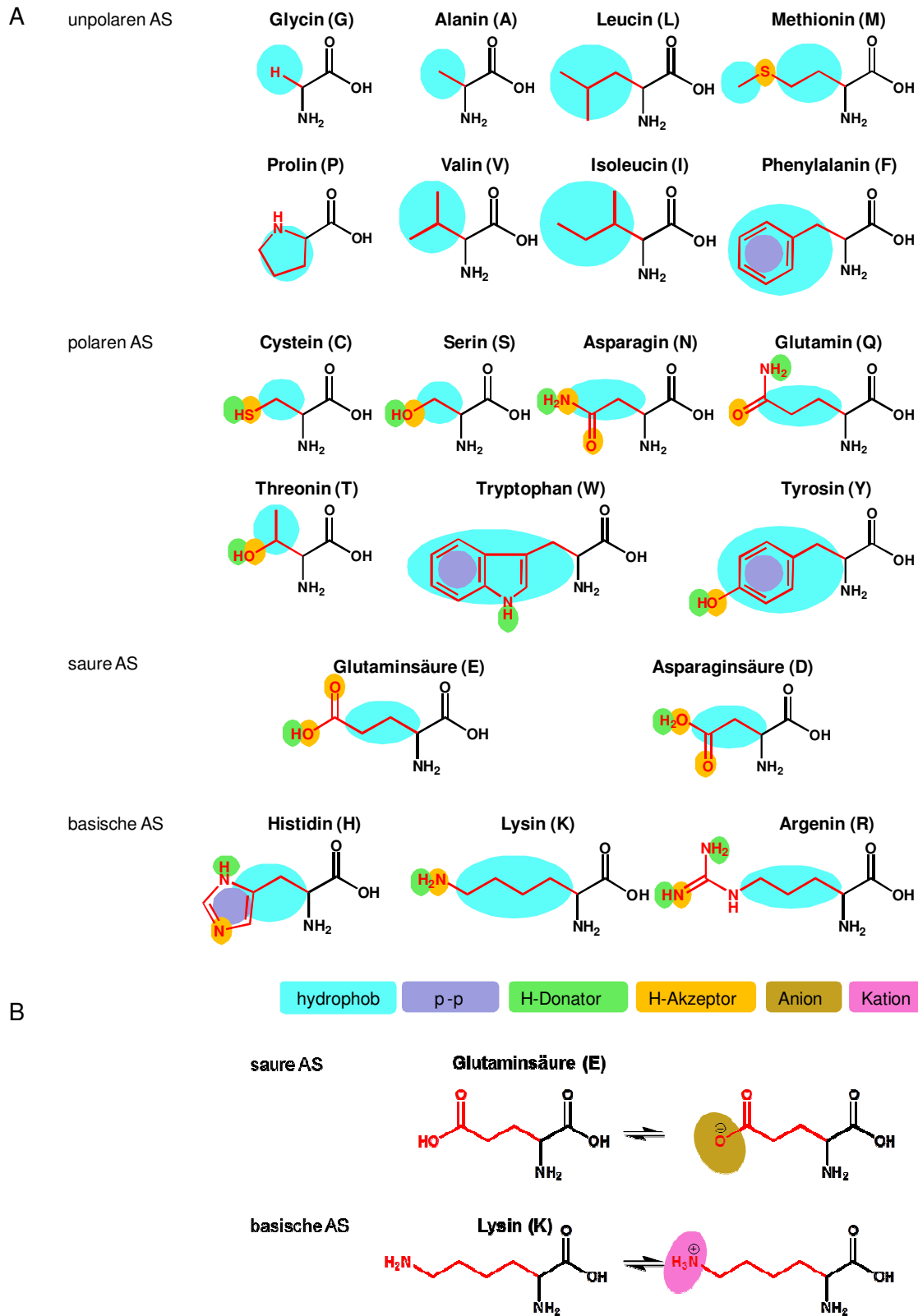


Abbildung 61: Eigenschaften der Aminosäuren (AS)

A) Darstellung aller 21 Aminosäuren mit ihren Eigenschaften (siehe Farbcode) und B) beispielhafte Anionen- bei sauren und Kationen- Entstehung bei basischen Aminosäuren (Jastorff et al., 2003)

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

„Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wurden nicht benutzt. Die Arbeit hat keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen. Es ist mir bekannt, dass ich bei Verwendung von Inhalten aus dem Internet zu kennzeichnen habe.

Nuthetal, den 14.02.2017

Stefanie Nowak