



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Einfluss einer hochkalorischen Ernährung auf die
Expression von Zelltyp-spezifischen Markern in der
Circumvallate Papillae bei Mäusen.“

verfasst von / submitted by

Victoria Anna Zabel BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2020 / Vienna 2020

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 659

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Lebensmittelchemie

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza

Mitbetreut von / Co-Supervisor

Dipl.-Ernährungswiss. Dr. Barbara Lieder

Danksagung

Der praktische Teil der Arbeit wurde von November 2018 bis Juli 2019 am Institut für Physiologische Chemie, welches von Univ.- Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza geleitet wird, erarbeitet.

Ich möchte mich recht herzlich bei Frau Univ.- Prof. Mag. Dr. Veronika Somoza für die Betreuung und die Bereitstellung des sehr spannenden Themas bedanken. Ein großes Danke geht hiermit an die gesamte Belegschaft des Institutes. Ihr alle seid mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden.

Außerdem möchte ich mich bei Dipl.-Ernährungswiss. Dr. Barbara Lieder und Dipl.-Ing. Agnes Reiner, Bakk. PhD bedanken. Ihr habt mich stets unterstützt und hattet immer die besten Tipps in jedem möglichen Themenbereich. Danke für Eure Aufmerksamkeit, Geduld und Anregungen.

Danke an meine Studienkollegen für zwei lustige und anstrengende Jahre. Ich denke, wir können stolz auf uns sein, schließlich sind wir die ersten Lebensmittelchemiker in Österreich. Danke an all meine Freunde vom Studentenheim und von „Zuhause“ für die besten „Lernpausen“ überhaupt. Auf euch kann ich mich immer verlassen. Danke.

An meine Eltern: Ich danke euch aus tiefstem Herzen für die seelische und vor allem finanzielle Unterstützung in den letzten sechs Jahren. Ohne euch wäre das nicht möglich gewesen – zumindest nicht so schnell. Besonderer Dank gilt dabei meiner Mama und meinem Bruder fürs oft sehr anstrengende Prüfen. Bussi!

Und zuletzt, danke an meinen Schatz für die seelische Unterstützung in den letzten drei Jahren. Danke, dass du mich immer aufgebaut und mir Mut gemacht hast, mich zum Lachen bringst und mich, egal wo, immer unterstützt hast. Ich liebe dich.

Inhaltsverzeichnis

1. Theoretischer Hintergrund	1
1.1 Geschmackssinn	3
1.2 Die Geschmacksknospen.....	5
1.3 Typ I Geschmackszellen	7
1.4 Typ II Geschmackszellen	9
1.4.1 Süßgeschmack.....	10
1.4.2 Umamigeschmack.....	11
1.4.3 Bittergeschmack.....	12
1.5 Typ III Geschmackszellen	13
1.6 Basal- und Stammzellen	16
1.7 Neurotransmitter.....	17
1.8 Ernährung und Geschmack	19
2. Die Fragestellung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Geräte.....	24
3.1.2 Materialien	25
3.1.3 Reagenzien	26
3.2 Methoden	29
3.2.1 Mausstudie	29
3.2.2 Gewebeaufarbeitung.....	30
3.2.3 RNA-Isolierung	31
3.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA.....	33
3.2.5 cDNA-Synthese.....	34
3.2.6 Quantitative RT Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) Analyse.....	37
3.2.7 Sequenzierung von PCR-Produkten	40
3.2.8 Gelelektrophorese	42
3.2.9 cDNA-Microarray.....	44
3.2.10 Statistische Auswertung.....	46
4. Ergebnisse	48
4.1 Methodenetablierung.....	48

4.1.1	<i>Gewebeaufarbeitung</i>	49
4.1.2	<i>RNA-Isolierung und cDNA-Synthese</i>	51
4.1.3	<i>Optimierung der RT-qPCR</i>	53
4.1.4	<i>Diskussion der Methodenetablierung</i>	58
4.2	Einfluss einer hochkalorischen Fütterung auf die Genexpressionslevel der <i>Circumvallate Papille</i>	60
4.2.1	<i>Analyse des Transkriptoms mittels cDNA-Microarrays</i>	61
4.2.2	<i>Genexpression ausgewählter Marker in der Circumvallate Papille</i>	68
4.2.3	<i>Wirkung auf fünf Bitterrezeptoren, 5-HTR3b, PDE6b und Slc2a1 ermittelt durch die RT-qPCR</i>	70
4.2.4	<i>Vergleich der Ergebnisse des DNA-Microarrays mit der RT-qPCR</i>	74
4.2.5	<i>Korrelation der Expressionsdaten mit Markern der Körperzusammensetzung, des Körpergewichtes und des Stoffwechsels</i>	76
5.	Diskussion	78
6.	Schlussbetrachtung	89
7.	Zusammenfassung	92
8.	Abstract	93
9.	Literaturverzeichnis	94
	Anhang	i

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung des Thalamus und der räumlichen Trennung von Sinnesreizen	3
Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Geschmackspapillen	5
Abbildung 3: Darstellung einer Geschmacksknospe.....	6
Abbildung 4: Transduktionsmechanismus von sauer für schwache und starke Säuren	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Geschmackssinn, Nahrungsaufnahme und Krankheiten	19
Abbildung 6: Beispiel einer Schmelzkurve bei gelungener Amplifikation (β -Aktin)	38
Abbildung 7: In der Methodenentwicklung optimierte Arbeitsschritte	48
Abbildung 8: RT-qPCR Amplifikationskurven mit reverser Transkriptase (links gelb, rechts blau) und ohne reverse Transkriptase (links hellgrün, rechts dunkelgrün) von <i>T1R2</i> von unterschiedlich aufgearbeiteten Gewebeproben	50
Abbildung 9: RT-qPCR Amplifikationskurven mit reverser Transkriptase (links gelb, rechts rot) und ohne reverse Transkriptase (links grün, rechts gelb) von β -Aktin von differentiellen Probenaufarbeitungen.....	52
Abbildung 10: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von <i>T1R3</i> und <i>GNAT3</i>	53
Abbildung 11: Optimierung der Primerkonzentration von <i>Snap-25</i>	55
Abbildung 12: Gelelektrophorese der PCR Produkte von <i>ACTB</i> und <i>KCNQ1</i> bei 50 nM und 100 nM	56
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte.....	60
Abbildung 14: Effekt der unterschiedlichen Fütterungen im Vergleich zur Kontrollgruppe	62
Abbildung 15: Die x-fache Änderung der 35 Bitterrezeptoren der Maus	64
Abbildung 16: Die x-fache Änderung von im Stoffwechsel relevanten Genen.....	65
Abbildung 17: Die x-fachen Änderungen von in der Signaltransduktion relevanten Genen	66
Abbildung 18: Darstellung der mittleren x-fachen Änderung, bezogen auf die sechs Gruppen, der verschiedenen Zelltypen.....	69
Abbildung 19: Effekt der Fütterung auf die mittlere x-fache Änderung der Bitterrezeptoren	71
Abbildung 20: Effekt der differentiellen Fütterung auf die mittlere x-fache Änderung von <i>5-HTR3b</i> und <i>PDE6b</i>	72

Abbildung 21: Effekt der differentiellen Fütterung auf die mittlere x-fache Änderung von <i>Slc2a1</i>	73
Abbildung 22: Vergleich der x-fachen Änderung (DNA-Microarray) und der mittleren x-fachen Änderung (RT-qPCR) ausgewählter Gene	74
Abbildung 23: Zusammenhang von Markern der Körperzusammensetzung, des Körpergewichts und des Stoffwechsels und den bestimmten Expressionwerten, dargestellt anhand einer Korrelationsmatrix	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer	27
Tabelle 2: Gruppenübersicht	29
Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	35
Tabelle 4: Temperaturprogramm des C1000 Touch™ Thermal Cycler bei der cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.....	35
Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die cDNA-Synthese mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit.....	36
Tabelle 6: Temperaturprogramm des C1000 Touch™ Thermal Cycler bei der cDNA-Synthese mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit	37
Tabelle 7: Temperaturprogramm mit dem Farbstoff SYBR® Green bei der Methodenentwicklung.....	40
Tabelle 8: Temperaturprogramm mit dem Farbstoff Luna® Universal bei der Messung der Studienproben.....	40
Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsmix der PCR mit dem Master Mix OneTaq® Hot Start.....	41
Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Synthese der cDNA der Microarrays	44
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primerkonzentrationen bei der RT-qPCR und mit der LinReg Software berechneten PCR-Effizienzen (n = 1-3)	57
Tabelle 12: Übersicht der Marker für Geschmackszelltypen	67

Abkürzungsverzeichnis

18S	18S ribosomale RNA
5-HT	Serotonin
5-HTR3b	Serotoninrezeptor 3b
ACTB	Beta-Aktin
AMP	Adenosinmonophosphat
AT	Österreich
ATP	Adenosintriphosphat
BAT	Braunes Fettgewebe
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
Car4	Carboanhydrase 4
cDNA	Komplementäre DNA
Chol.	Cholesterin
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
Entpd2	Kodierendes Gen für NTPDase
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
gDNA	Genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GLAST	Glutamat-Aspartat Transporter
GLUT	Glucosetransporter Typ
GNAT3	Gustducin

GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
Hes6	Hairy and enhancer of split 6
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
KCNQ1	Kaliumkanal K _v 7.1
Krt8	Keratin 8
LDL	Lipoprotein niedriger Dichte
MCD	McDonald's
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	New England BioLabs GmbH
NFW	Nuklease-freies Wasser
NTPDase	Nucleosid-Triphosphat-Diphospho-Hydrolase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PGF	Perigonadales Fett
PKD	Polyzystische Nierenerkrankung
PRF	Perirenales Fett
RMA	Robust Microchip Averaging
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RT-qPCR	Quantitative RT Polymerasekettenreaktion
SGLT1	Natrium/Glucose-Cotransporter

Shh	Sonic Hedgehog
SK	Slowakei
Slc1a3	Kodierendes Gen für GLAST
Slc2a1	Kodierendes Gen für GLUT1
Snap-25	Synaptosomalassoziiertes Protein 25
SNARE	Lösliches N-Ethylmaleimid-Sensitivfaktor Haftprotein
Sox2	Marker für Stammzellen
SSPE	Salz-Natrium-Phosphat-EDTA
T1Rs	Geschmacksrezeptoren des Typs 1
T2Rs	Geschmacksrezeptoren des Typs 2
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM5	Transientes Rezeptorpotential Kationenkanal
Tween-20	Polysorbat-20
WAT	Weißes Fettgewebe

1. Theoretischer Hintergrund

„Mit dem guten Geschmack ist es ganz einfach: Man nehme von allem nur das Beste.“

- Oscar Wilde (1854-1900)

Primär dient die Zufuhr von Nahrung dazu, dass unser Körper mit Nährstoffen versorgt wird. Sekundär ist Essen, wie schon Oscar Wilde ausdrückte, ein Genuss. Bei der Speisenwahl spielen vor allem Genuss, Geschmack, Preis und Bequemlichkeit eine wichtige Rolle. Der Gesundheitsaspekt wird meistens außen vorgelassen [1]. Durch ein reges Angebot an Nahrung in der heutigen Zeit herrscht in der industrialisierten Welt oft eine zu hohe Nachfrage nach fettigen, hochkalorischen Gerichten. Eine hochkalorische Ernährung und zu wenig Bewegung, sprich eine positive Energiebilanz, führen zu Adipositas. Dadurch steigt gleichzeitig das Risiko, eine nichtübertragbare Krankheit, wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes oder Krebs zu entwickeln [2].

Neben der Entwicklung von Krankheiten können durch die Nahrungsaufnahme Veränderungen in der Genaktivität auftreten. Aktuelle Studien zeigen Modifikationen von Genexpressionslevels in den Geschmacksknospen als Folge veränderter Nahrungsaufnahme. Solche Modifikationen können die Ursache von Übergewicht sein [3–5] und die Nachkommen betreffen [4, 6]. In der Studie von Archer et al. [5] wurde gezeigt, dass es bei übergewichtigen Frauen zu einer Abnahme von Geschmackspapillen in der *Circumvallate* Papille kam. Die fettreiche Fütterung von Mäusen über acht Wochen erzielte bei Kaufman et al. ähnliche Ergebnisse [3]. Die Abnahme von Geschmackspapillen resultierte aus einer verminderten Expression von Sonic Hedgehog (*Shh*) [3, 5], welches für die Entwicklung von Geschmackspapillen [7, 8], die Erneuerung von Geschmackszellen [9] und die Differenzierung dieser in verschiedene Typen verantwortlich ist [10].

Zusammengefasst lässt sich sagen: Eine positive Energiebilanz führt langfristig zu Adipositas oder Übergewicht bzw. zu den daraus resultierenden nichtübertragbaren Krankheiten. Letzte Schätzungen lassen vermuten, dass in Europa 30-70 % von Übergewicht betroffen sind [11]. Noch nicht vollständig geklärt ist, welchen Einfluss die Nahrungsaufnahme auf das Vorkommen der verschiedenen Geschmackszelltypen innerhalb der Geschmacksknospen und somit auf die Geschmackswahrnehmung hat. Durch solche Veränderungen könnte wiederum das

zukünftige Essverhalten beeinflusst werden, wodurch es zur Entwicklung von Folgeerkrankungen kommen könnte.

In dieser Arbeit soll zunächst eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, die *Circumvallate* Papille aus gefrorenen Mäusezungen zu entfernen, um im Anschluss die RNA dieser zu isolieren und die Genexpression zu analysieren. Das Hauptziel der Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine hochkalorische Ernährung entsprechend westlicher Ernährungsformen die Geschmackswahrnehmung auf zellulärer Ebene beeinflusst.

1.1 Geschmackssinn

Der Geschmackssinn stellt fest, ob dem Körper verträgliche Nahrung oder eventuell giftige Stoffe zugeführt werden. Neben dem Überprüfen der Nahrung auf mögliche unverträgliche Stoffe ist der Geschmackssinn die Voraussetzung der Genusswahrnehmung. Grundsätzlich wird zwischen fünf anerkannten Geschmacksrichtungen unterscheiden: süß, sauer, bitter, salzig und umami. Zurzeit werden noch weitere Geschmacksrichtungen, wie z.B. fettig und metallisch diskutiert, diese sind bis dato allerdings nicht anerkannt.

Die Geschmackswahrnehmung beginnt in den Sinneszellen, die sich in den Geschmacksknospen befinden. Lipophile Stoffe gelangen ohne Rezeptor in eine Zelle, sie diffundieren durch die Zellmembran und können z.B. an intrazelluläre Rezeptoren binden. Im Gegensatz dazu sind hydrophile Moleküle auf Rezeptoren angewiesen, um eine Signaltransduktion in der Zelle auszulösen. Dabei wird zwischen drei verschiedenen Rezeptortypen unterschieden: Enzymgekoppelte Rezeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) und Ionenkanäle [12]. Die Rezeptoren werden für die Registrierung eines Signals benötigt. Die Signaltransduktionen der fünf Geschmacksqualitäten wird in den Kapiteln 1.3 bis 1.5 thematisiert.

Während der Signaltransduktion wird der Reiz laufend verstärkt. Durch diese Verstärkung während der Signalumwandlung wird ermöglicht, dass einzelne Signalmoleküle bereits eine Sinneswahrnehmung auslösen können.

Die Weiterleitung eines Reizes zum Gehirn ist notwendig, damit wir diesen bewusst wahrnehmen können. Wurde das Signal oder der Reiz in ein elektrisches Signal umgewandelt, wird dieses in Richtung Hirn weitergeleitet. Geschmackszellen besitzen keine Axone und sind auf die Weiterleitung des produzierten Signals von angrenzenden Nervenfasern angewiesen.

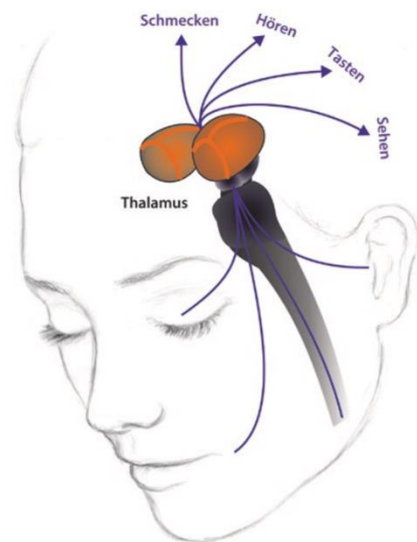


Abbildung 1: Darstellung des Thalamus und der räumlichen Trennung von Sinnesreizen

Quelle: [13]

Die Sinneswahrnehmungen werden an genau definierten Arealen im Gehirn weiterverarbeitet. Dabei ist der Thalamus das Zentrum des Geschehens: Sämtliche Axone, die die Sinnesinformation aller fünf Sinne weiterleiten, münden in den Thalamus, wo diese sortiert werden und zu den jeweiligen Kernen weitergeleitet werden (Abbildung 1).

Unter Kernen versteht man hier eine Ansammlung von Nervenzellen, wobei es je einen Kern für jeden Sinn gibt. Von den Kernen gelangt das Signal in die Großhirnrinde, den Cortex, wo die Information decodiert und bewusst wahrgenommen wird. Die räumliche Trennung der Sinne ist für die korrekte Decodierung eines Reizes notwendig und wird bis dorthin beibehalten.

Dank der sogenannten selektiven Wahrnehmung registriert der Mensch nur bestimmte, momentan wichtige Informationen. Der Thalamus spielt hier eine zentrale Rolle: Gehirnregionen, die der Thalamus mit Sinnesinformationen beliefert, schicken über Nervenfasern Kontrollsignale zurück. Es entsteht eine Art Rückkopplungsschleife [13].

Kurz zusammengefasst: Ein externer Reiz z.B. ein Glucosemolekül trifft auf eine Sinneszelle in den Geschmacksknospen. Das Molekül bindet an den GPCR und löst dadurch eine Signalkaskade aus, wodurch sich das Signal verstärkt. Entsteht ein Aktionspotential, wird es über Nervenfasern bis zum Thalamus weitergeleitet. Dort werden alle Sinnesreize geordnet und im Anschluss zum Cortex geleitet, wo das Molekül bewusst wahrgenommen wird.

1.2 Die Geschmacksknospen

Zerkauen wir Nahrung, vermischt sich diese mit Speichel und gelangt zu den Geschmackspapillen. Diese befinden sich im gesamten Mundraum, vor allem auf der Zunge, im Gaumendach und im hinteren Rachenraum der Epiglottis [14]. Abhängig von der mikroskopischen Form und deren Lage unterscheidet man zwischen vier Typen von Papillen:

- Pilzpapille (*Papillae fungiformes*)
- Blätterpapille (*Papillae foliatae*)
- Wallpapille (*Papillae vallatae*)
- Fadenpapille (*Papillae filiformes*)

Die Pilz-, Blätter- und Wallpapille beherbergen eine unterschiedliche Anzahl an Geschmacksknospen (Abbildung 2) und fungieren in der Geschmackswahrnehmung.

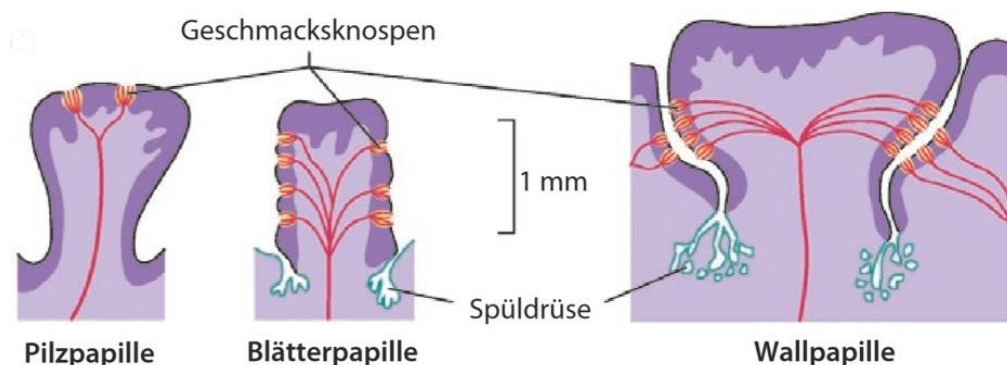


Abbildung 2: Darstellung der unterschiedlichen Geschmackspapillen

Quelle: [13]

Ungefähr zwei Drittel des vorderen Zungenrückens sind mit Pilzpapillen übersät – ca. 200-400 Stück. Eine pilzförmige Papille besitzt vier bis fünf Geschmacksknospen. Am hinteren seitlichen Zungenrand befinden sich 15-20 faltenförmige Blattpapillen. Eine Blattpapille beherbergt ca. 50 Geschmacksknospen. Sieben bis zwölf große Wallpapillen sind auf dem hinteren Zungenrücken kurz vor dem V-förmigen *Sculus terminalis* an der Grenze zum Zungengrund lokalisiert [15]. Aufgrund ihrer Form wird die Wallpapille im Englischen auch circumvallate (wall-like) papillae genannt [16]. Eine Wallpapille besitzt ungefähr 100 Geschmacksknospen und dient zusätzlich dazu, die

Schleimhautoberfläche zu vergrößern. Fadenpapillen sind auf dem gesamten Zungenrücken gleichmäßig verteilt. Die Fadenpapille (*Papillae filiformes*) besitzt ausschließlich taktile Funktionen und dient der mechanischen Beurteilung der Nahrung [15].

In Abbildung 3 ist der Aufbau einer Geschmacksknospe erkennbar: Das Epithel umgibt die Knospe und bildet am oberen Ende eine Öffnung. In den Porus (*Porus gustatorius*) ragen die Ausstülpungen der Sinneszellen, diese werden als Mikrovilli bezeichnet. Daran sitzen die molekularen Geschmacksrezeptoren, Quelle: [12]

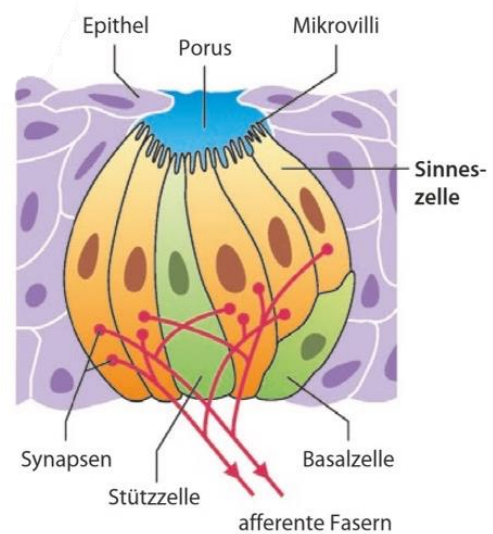


Abbildung 3: Darstellung einer Geschmacksknospe

wodurch gustatorische Signale ausgelöst werden können. Die Knospe selbst besteht aus Sinneszellen, Stützzellen und Basalzellen. Aus letzteren bilden sich regelmäßig neue Sinneszellen [13]. Insgesamt besteht eine Geschmacksknospe aus 60-120 länglichen Zellen. Diese sind an der apikalen Seite über Tight Junctions miteinander verbunden und sind so vor schädigenden Substanzen – wie Wasser, Ionen – geschützt [15].

Sinneszellen lassen sich, abhängig von ihrer Funktion, in drei Haupttypen beziehungsweise vier Zelltypen einteilen. Diese werden in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

1.3 Typ I Geschmackszellen

Rund die Hälfte aller Geschmackszellen in einer Geschmacksknospe sind Zellen des Typs I. Die Zellen besitzen schmale, unregelmäßig geformte Kerne und sind elektronendicht [17, 18]. Es sind gliaähnliche Zellen, welche lange Mikrovilli tragen und Substanzen in den Geschmacksporus sezernieren [15]. Dabei handelt es sich meist um Enzyme und Transporter die notwendig sind, um extrazelluläre Neurotransmitter zu entfernen [19, 20].

Geschmacksrichtung und Signaltransduktionsweg

Der Zelltyp I gilt momentan als der wahrscheinlichste Typ, der für den Salzgeschmack verantwortlich ist. Allerdings gibt es Hinweise für alle drei Geschmackszelltypen. Bisher ist also nicht klar, welcher Geschmackszelltyp für die Signaltransduktion des Salzgeschmackes verantwortlich ist und welcher Transduktionsmechanismus in weiterer Folge aktiviert wird.

Das Diuretikum Amilorid, welches als Inhibitor des epithelialen Natriumkanals (ENaC) gilt, vermindert die NaCl-Antwort in afferenten Nerven [21, 22]. Eine sensorische Abschwächung des Salzgeschmacks galt lange als der Beweis dafür, dass der Amilorid-sensitive ENaC eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung spielt [22, 23]. Allerdings trat nicht nur eine Schwächung des Salzgeschmackes auf, sondern auch eine des Süßgeschmackes.

Das Ausschalten des Gens, welches für die α -Untereinheit des ENaC codiert, bewirkte, dass die neuronalen Reaktionen und das Verhalten gegenüber NaCl bei Mäusen verloren ging [24]. Diese Daten zeigen, dass der Kanal notwendig für die Detektion von Salz bei Nagern ist. Beim Menschen wurde allerdings noch kein direkter Beweis gefunden.

Die Signaltransduktion des Salzgeschmackes ist noch nicht vollständig geklärt und benötigt noch weitere Aufklärung.

Markergene/-proteine

Eine Typ I Zelle produziert Enzyme, um Adenosintriphosphat (ATP) abzubauen (siehe Punkt 1.7). Die Nucleosid-Triphosphat-Diphospho-Hydrolase (NTPDase) ist ein Teil der ectoATPase. Dabei liegt in den Geschmacksknospen der Maus vorrangig NTPDase2 vor [19]. Das kodierende Gen ist *Entpd2*.

Der Glutamat-Aspartat Transporter (GLAST) fungiert als weiterer Marker für eine Geschmackszelle des Typ I [25]. Das Gen *Slc1a3* kodiert für diesen Transporter.

1.4 Typ II Geschmackszellen

Zellen des Typ II sind im Durchmesser größer, als die des Typ I und machen ca. ein Drittel aller Geschmackszellen einer Geschmacksknospe aus. Sie besitzen an ihrer apikalen Seite Mikrovilli, diese sind allerdings kürzer als die der Typ I Zellen. Die Mikrovilli ragen in den *Porus gustatorius* und tragen gustatorische Rezeptoren für die Geschmacksqualitäten bitter, süß oder umami [15].

Bitterrezeptoren gehören zu den Geschmacksrezeptoren des Typs 2 (T2Rs). Bei Säugetieren sind mehr als 20 Bitterrezeptoren bekannt. Im Unterschied dazu sind bei Geschmackszellen des Typs 1 (T1Rs) nur drei Vertreter bekannt: T1R1, T1R2, T2R3 [26]. Pro Geschmackszelle können 4-11 Bitterrezeptoren vorkommen [27, 28].

Signaltransduktionsweg

Die Bindung eines Signalmoleküls an Geschmackszellen, die zur Gruppe der GPCRs gehören, bewirkt eine Konformationsänderung und dadurch eine Aktivierung des Rezeptorproteins. Es kommt zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) und der Aufspaltung des G-Proteins in die Untereinheit α und den Komplex der Untereinheiten $\beta\gamma$. Die α -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C, welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol spaltet. Die entstehenden Produkte dienen beide als Second Messenger. Diacylglycerol bleibt in der Membran und stimuliert die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C. IP_3 hingegen bindet an IP_3 -spezifische Ionenkanäle am Endoplasmatischen Retikulum, wodurch das im Endoplasmatischen Retikulum gespeicherte Calcium ins Zytoplasma gelangt [13]. Die erhöhten Calciumspiegel führen zur Öffnung von TRPM5, wodurch die Zelle depolarisiert wird [26].

Der vom G-Protein ausgehende Signaltransduktionsvorgang ist zeitlich limitiert, da das GTP wieder langsam zu GDP und P_i hydrolysiert und der Ausgangszustand wiederhergestellt wird.

Markergene/-proteine

Spezifisch für eine Typ II Zelle ist die α -Untereinheit des G-Proteins – Gustducin [29, 30]. Außerdem sind T1Rs und T2Rs, die Rezeptoren der Geschmacksrichtungen bitter, süß und umami, häufig genutzte Marker für die Erkennung von Typ II Zellen [31].

Bitter, süß und umami-schmeckende Stoffe werden von Typ II Zellen detektiert [32–34]. Obwohl dieser Zelltyp für die Erkennung von drei Geschmacksqualitäten zuständig ist, exprimiert eine einzelne Typ II Geschmackszelle nur Rezeptoren für eine der drei Qualitäten [35, 36].

1.4.1 Süßgeschmack

Der Rezeptor des Süßgeschmacks ist ein Heterodimer von zwei GPCR – T1R2 und T1R3. Ihre Funktion wurde bei Screenings der *Circumvallate* Papille von Mäusen 1999 entdeckt [31]. Kultivierte Zellen, die mit T1R2 und T1R3 transfiziert wurden, reagierten auf Saccharose, Fructose, künstliche Süßstoffe und einige D-Aminosäuren, welche süßen Geschmack vermitteln [37, 38]. Das Heterodimer reagiert folglich auf sämtliche süß-schmeckenden Verbindungen und ist nicht strukturspezifisch.

Der Rezeptor weist zahlreiche Bindungsstellen auf. Wie Roper und Chaudhari [26] zusammenfasst, binden alle süß-schmeckenden Verbindungen an das Heterodimer, wenn auch an etwas unterschiedlichen Positionen. Einzeln betrachtet können beide Domänen – T1R2 und T1R3 – viele Zucker und Zuckeralkohole binden. Zucker und Dipeptid-Süßstoffe (z.B. Aspartam) binden in der Spalte der Venusfliegenfalle-Domäne, allerdings nicht genau an derselben Stelle.

Liegt ein Mangel an T1R2 oder T1R3 bei Mäusen vor, wurde gezeigt, dass dadurch ihr Verhalten gegenüber Zuckern und künstlichen Süßstoffen und die neuronale Antwort modifiziert ist [39]. Dabei liegt das Augenmerk darauf, dass trotz des Mangels einer der beiden Rezeptoren eine neuronale Antwort gegeben war. Daher entwickelte sich die These, dass T1R3-unabhängige Signaltransduktionswege existieren müssen [40, 41]. Diese verhärtete sich, als entdeckt wurde, dass bei Mäusen, denen das Gen *T1R3* fehlte, nach Stimulation mit Zuckern trotzdem Verhaltens- und Nervenreaktionen ausgelöst wurden [40].

Es wird vermutet, dass der Glucosetransporter Typ 4 (GLUT4) und der Natrium/Glucose-Cotransporter (SGLT1) bei der Erkennung des Süßgeschmackes eine Rolle spielen. Beim Glucosetransport in die Geschmackszellen Typ II steigen vorübergehend die intrazellulären ATP Level. Das dabei gebildete ATP sorgt wiederum für eine Blockade von Kalium-Kanälen, wodurch die Zelle depolarisiert wird [42]. Der Depolarisationsweg ist nicht auf Glucose beschränkt: Disaccharide – wie Saccharose – werden zu Hexosen hydrolysiert und können, wie oben beschrieben, die Signaltransduktion auf diese Art und Weise auslösen [43].

1.4.2 Umamigeschmack

Den Geschmack umami vermitteln Aminosäuren, wobei vor allem die Salze Glutamat und Aspartat, genauer gesagt Mononatriumglutamat, als Vertreter gelten. Glutamat ist für den herzhaften Geschmack in Fleisch, Fisch, Käse und manchen Gemüsesorten verantwortlich. Eine weitere umami-aktive Substanz ist 5'-Inosinmonophosphat [44]. Der Umamigeschmack wird ebenfalls vom Geschmackszelltyp II erkannt.

Der Rezeptor für den Umamigeschmack ist, wie auch der für den süßen Geschmack, ein GPCR. Es handelt sich um ein Heterodimer aus den Rezeptoren T1R1 und T1R3 [38, 39, 45]. Dabei wurde u.a. in knock-out Experimenten festgestellt, dass das Heterodimer für die Detektion des Umamigeschmacks verantwortlich ist [39]. Andere Studien zeigten, dass bei knock-out Experimenten der Rezeptoren keine Veränderung hinsichtlich Verhalten und der neuronalen Antwort gegeben war [40]. Letzteres lässt darauf schließen, dass das Heterodimer nicht hauptverantwortlich für die Erkennung des umami Geschmackes ist.

Ebenfalls in Sinneszellen vorhanden sind die N-Terminal verkürzten, geschmacksspezifischen und metabotropen Rezeptoren mGluR4 [46, 47] und mGluR1 [48]. Diese wurden bisher nur bei Mäusen nachgewiesen. Die Rezeptoren werden durch übliche, in der Nahrung vorkommende Konzentrationen an Mononatriumglutamat aktiviert [46]. Untersuchungen von Mäusen, denen es an dem für mGluR4 codierenden Gen fehlte, zeigten eine verminderte Antwort auf Mononatriumglutamat und 5'-Inosinmonophosphat [49].

1.4.3 Bittergeschmack

Bitterstoffe werden von Geschmacksrezeptoren des Typs 2 detektiert. Die Anzahl von Bitterrezeptoren variiert bei Säugetieren stark. Während Mäuse 35 Bitterrezeptoren besitzen werden beim Menschen 25 Bitterrezeptoren gezählt. Es wird vermutet, dass sich die Vielzahl an Bitterrezeptoren aus evolutionären Gründen ergeben hat. Dabei soll primär der Verzehr von giftigen bzw. schädlichen Lebensmitteln verhindert werden. Das größere Repertoire an Bitterrezeptorgenen der Maus lässt darauf schließen, dass diese im Vergleich zum Menschen mehrere Bitterstoffe unterschiedlichster chemischer Strukturen wahrnehmen können [50].

Bitterer Geschmack wird von einer Vielzahl an Verbindungen vermittelt, unter anderem auch von toxischen Stoffen. Bitterstoffe weisen starke strukturelle Unterschiede, wie z.B. in Größe, Ladung und hydrophobe Eigenschaften auf [51].

Während manche Bitterrezeptoren nur auf eine bekannte Substanz reagieren, können andere Bitterrezeptoren eine Vielzahl von unterschiedlichen Bitterstoffen binden. Dies zeigte eine Studie, die 104 natürliche oder synthetische Bitterstoffe an den 25 Bitterrezeptoren, welche beim Menschen identifiziert sind, testete [52]. Für manche Bitterrezeptoren sind aber auch noch keine Liganden bekannt.

Die für Bitterrezeptoren kodierenden Gene der Maus und des Menschen sind in Ansammlungen am Chromosom zu finden [50, 53, 54]. Während die *TAS2R* Sequenzen des Menschen auf den Chromosomen 5, 7 und 12 zu finden sind, sind die *Tas2r* Gene der Maus hauptsächlich am Chromosom 6 lokalisiert [53].

Die meisten *Tas2r* Gene, die beim Menschen auf den Chromosomen 5 und 7 und bei Mäusen auf den Chromosomen 2 und 15 lokalisiert sind, weisen eine Eins-zu-eins-Orthologie auf. Diese konservierte Verbindung zwischen Maus und Mensch hat sich möglicherweise schon vor der Divergenz der Primaten-Nager-Linie entwickelt und ermöglicht die Erkennung von Bitterstoffen, welche für beide Spezies gleichermaßen wichtig sind [53].

1.5 Typ III Geschmackszellen

Typ III Geschmackszellen sind mit einem Vorkommen von 2-20 % der Zellen in Geschmacksknospen der am seltensten auftretende Typ [26]. Dabei weisen Geschmacksknospen, welche sich auf Pilzpapillen befinden, oft nur eine Typ III Zelle auf. Dahingegen exprimieren Geschmacksknospen am hinteren Teil der Zunge bis zu zehn Typ III Geschmackszellen. Die Zellen sind schlank und weisen längliche Kerne auf. Im Gegensatz zu Typ II Zellen exprimiert dieser Zelltyp keine GPCR, sondern die unten angeführte Maschinerie. Zusätzlich werden bei diesen Zellen Synapsen, Vesikel und SNARE-Proteine gefunden. Der Geschmack sauer wird von Typ III Zellen erkannt [55–57].

Geschmacksrichtung und Signaltransduktionsweg

Auslöser für eine Signalübertragung des sauren Geschmacks ist eine Abnahme des intrazellulären pH-Wertes, also eine Ansäuerung [58]. Aufgrund der höheren Membranpermeabilität galten schwache Säuren, wie Zitronensäure oder Essigsäure, als bessere Stimuli für den sauren Geschmack als starke Säuren. Dies wurde dadurch begründet, da schwache Säuren im undissoziierten Zustand die Zellmembran passieren können und intrazellulär Protonen frei werden. Starke Säuren dissoziieren meist extrazellulär. Die Membran ist allerdings undurchlässig für die entstandenen Protonen. Durch die zelluläre Ansäuerung depolarisiert die Zelle und in Folge dessen wird Calcium ausgeschüttet [55, 59, 60].

Lange wurde nach möglichen Ionenkanälen geforscht, welche sauren Geschmack vermitteln. Dabei im Gespräch waren unter anderem Proteine der polyzystischen Nierenerkrankung (PKD1L3, PKD2L1) [56, 61] und der einwärts, gleichgerichtete Kaliumkanal ($K_{IR2.1}$) [59].

Bei einer RNA-Sequenzanalyse von Geschmackszellen der Maus wurden vor allem jene Zellen betrachtet, die PKDL1 tragen, aber nicht TRPM5. Da letztere nur auf

Geschmackszellen des Typs II zu finden sind. Dabei wurde ein protonenselektiver, Zinkempfindlicher Ionenkanal – Otopetrin 1 (Otop1) – entdeckt. Weitere Analysen zeigten, dass der Ionenkanal für den Protonenstrom in Geschmackszellen benötigt wird [62].

Ramsey und DeSimone [63] fassten die Signaltransduktion des sauren Geschmacks zusammen (siehe Abbildung 4): Schwache Säuren gelangen unspezifisch in ihrer neutralen Form in die Zelle und dissoziieren. Ebenfalls möglich ist, dass der Weg schwacher Säuren noch nicht identifiziert ist. Dies wird in der Abbildung 4 mit violetten Strichen dargestellt. Starke Säuren dissoziieren extrazellulär. Die entstandenen Protonen gelangen über Otop1 in die Zelle und lösen eine Depolarisation der Zelle aus, wodurch basolaterale Calciumkanäle (Ca_v) aktiviert werden. Der Protoneneintritt durch

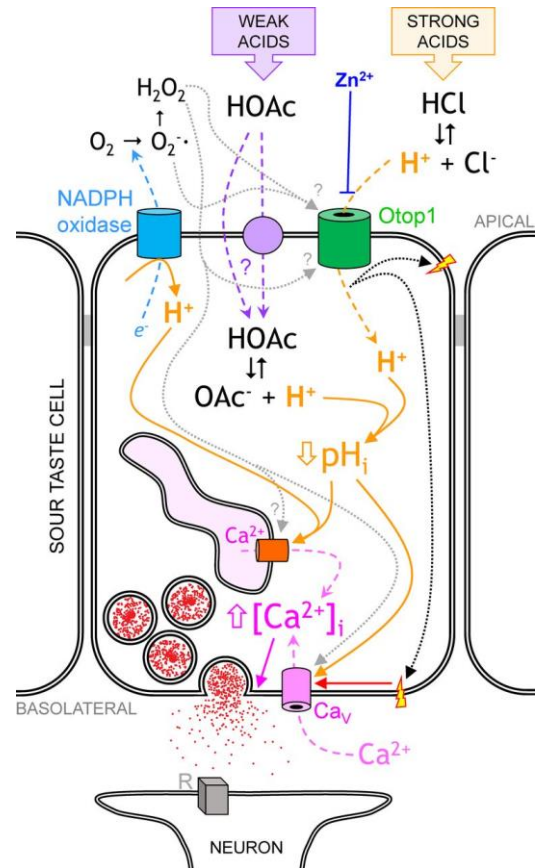


Abbildung 4: Transduktionsmechanismus von saurem Geschmack für schwache und starke Säuren [47]

den Ionenkanal und die intrazelluläre Dissoziation schwacher Säuren führen zu einer intrazellulären Ansäuerung. Durch die geöffneten Calciumkanäle und die Öffnung von intrazellulären Calciumspeichern, steigt der Gehalt an freiem Calcium in der Zelle. Reaktive Sauerstoffspezies können Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes hervorrufen, indem sie die Otop1-Aktivität direkt verändern oder z.B. Calciumkanäle modulieren.

Möglicherweise werden, durch den hohen Calciumspiegel, intrazellulär Vesikel angeregt, wodurch es an der basolateralen Membran zur Freisetzung von Neurotransmittern und zur Aktivierung von postsynaptischen Rezeptoren kommt [63].

Markergene/-proteine

SNARE-Komplexe sind charakteristisch für den Typ III. Dabei handelt es sich um Proteinkomplexe in Vesikeln aus mehreren SNARE-Proteinen. Das synaptosomal-assoziierte Protein 25 (Snap-25) ist ein solches SNARE-Protein und wird vom Gen *Snap-25* kodiert [64]. Das Enzym Carboanhydrase 4 (Car4) ist ein weiterer Marker von Geschmackszellen des Typs III und wird vom Gen *Car4* kodiert [65].

1.6 Basal- und Stammzellen

Geschmacksknospen werden lebenslang durch Basal- und Stammzellen erhalten. Basalzellen oder auch Typ IV Zellen genannt, dienen dazu, Geschmacksvorläuferzellen zu bilden. Geschmackszellen sind mit einer Lebensdauer von nur zehn Tagen relativ kurzlebig [15]. Aus den Basalzellen differenzieren sich fortlaufend neue Geschmackszellen.

Dabei dient das Protein Sonic Hedgehog, das von Basalzellen exprimiert wird, für die Entwicklung von Geschmackspapillen [7, 8], die Erneuerung von Geschmackszellen [9] und die Differenzierung dieser in verschiedene Typen [10]. Die geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2 (Sox2) ist ein Transkriptionsfaktor der Stammzellen. Aus Stammzellen entstehen durch Zellteilung proliferierende Zellen, die sich zu Basalzellen entwickeln [66].

Markergene/-proteine

Der am besten bekannte Marker für Basalzellen ist das Protein Shh [67, 68]. Der Transkriptionsfaktor Hairy and enhancer of split 6 (Hes6) wurde ebenfalls in Basalzellen nachgewiesen [69]. Spezifisch für Stammzellen sind die Marker Sox2 [70] und das Antigen Ki-67 [71].

1.7 Neurotransmitter

Zurzeit sind fünf Neurotransmitter in Geschmacksknospen identifiziert: ATP, Serotonin (5-HT), Gamma-Aminobuttersäure (GABA), Acetylcholin und Noradrenalin.

ATP

Erste Anzeichen dafür, dass ATP ein Neurotransmitter ist, wurden bei der Immunfärbung von P2X-Purinozeptoren in Nerven erhalten. Bei Letzteren wurde bereits vermutet, dass diese in Zusammenhang mit der Signaltransduktion von sensorischen Signalen stehen [72]. Dass ATP als Neurotransmitter in der Geschmackswahrnehmung fungiert, wurde gezeigt, als ein Epithelstück der Zunge bzw. die darauf sitzenden Geschmacksknospen ATP sekretierten, sobald dieses mit bitteren Substanzen stimuliert wurde. Nach der Deaktivierung von Purinorezeptoren P2X2 und P2X3 waren die betroffenen Mäuse nicht mehr in der Lage, süß, umami, bitter und salzig wahrzunehmen [73].

In weiteren Experimenten wurde die Transmitterausschüttung mit Hilfe von zellulären Biosensoren beobachtet. Nach Stimulation zeigte sich bei Typ II Zellen eine Sekretion von ATP [74, 75]. Dabei kommt es zu einer positiven, autokrinen Rückkoppelung über die P2X- und P2Y-Rezeptoren, welche von Typ II Zellen exprimiert werden [76, 77]. Wird das autokrine Feedback gestört, wird nicht genügend ATP ausgeschieden, um die Nerven zu aktivieren. Das Calciumhomoöstase-Modulatorprotein 1 ist zuständig für die Freisetzung von ATP. Diese werden durch geschmacksbedingte Aktionspotentiale geöffnet [78].

Das Beenden der synaptischen Übertragung – der Abbau von ATP – wird von EctoATPasen, welche sich auf der Oberfläche von Typ I Zellen befinden [19, 20], und von Ectonucleotidasen, welche von Typ III Zellen produziert werden, vermittelt [79]. Die Abbauprodukte von ATP tragen wiederum zur positiven, autokrinen Rückkoppelung bei [77, 79]. Das von Typ II Zellen ausgeschüttete ATP dient als parakriner Stimulus für die Ausschüttung von Serotonin von Typ III Zellen [74].

Serotonin

Serotonin war der erste experimentell nachgewiesene Neurotransmitter [80]. Es wurde vermutet, dass Typ III Zellen für die Synthese und Speicherung von Serotonin in synaptischen Vesikeln verantwortlich sind. Mit Hilfe von zellulären Biosensoren konnte bewiesen werden, dass in Folge eines Geschmacksstimulus Serotonin von Geschmackszellen des Typs III sekretiert wird [81–83].

Durch Stimulation von Typ III Zellen mit Kaliumchlorid und sauren Geschmacksstoffen wurde, abhängig von Calcium und der Depolarisation der Zelle, Serotonin ausgeschüttet [84]. Die Ausschüttung des Neurotransmitters wird durch zwei unterschiedliche Mechanismen geregelt [80]: Entweder durch die Mobilisierung von intrazellulären Calciumspeichern nach ATP-Stimulation [77] oder durch einen Calcium Einstrom, ausgelöst durch saure Geschmackseinwirkung oder eine durch Kaliumchlorid induzierte Depolarisation [84, 85]. Außerdem wird Serotonin, als Folge des von Typ II sekretierten ATP, freigesetzt.

GABA

Der Neurotransmitter GABA wird von Typ II Zellen synthetisiert, sekretiert und gespeichert [84, 86, 87]. Auf dem Geschmackzelltyp werden GABA-Typ A Rezeptoren und Typ B Rezeptoren exprimiert [87]. GABA hemmt in der Geschmacksknospe möglicherweise die Freisetzung von ATP aus den Typ II Zellen [84].

Acetylcholin und Noradrenalin

Zusätzlich zu ATP und GABA schütten Geschmackszellen des Typ II ebenfalls Acetylcholin aus. Dies wurde aufgrund der hohen Aktivität der Acetylcholinesterase bereits vermutet [88, 89]. Die Freisetzung von Acetylcholin scheint Teil der positiven autokrinen Rückkoppelung zu sein, wodurch die Geschmackszelle oder eine benachbarte Geschmackszelle des Typ II verstärkt ATP sekretiert.

Die Funktion von Noradrenalin ist noch nicht vollständig geklärt. Bisher wurde in Zellassays mit Hilfe von Biosensoren festgestellt, dass Typ III Zellen Noradrenalin aufnehmen und wieder freisetzen können [81, 90].

1.8 Ernährung und Geschmack

Eine ausgewogene gesunde Ernährung ist wichtig für die physische und psychische Gesundheit unseres Körpers. Die Ernährungspyramide beinhaltet Empfehlungen zu allen Produktgruppen und deren Aufnahmemengen, wobei vor allem Verzehrsmengen eine wichtige Rolle spielen. Eine Ernährung entsprechend der Ernährungspyramide liefert dem menschlichen Körper alle benötigten Nährstoffe und die daraus resultierende Energie [91]. Die Auswahl von geeigneten Lebensmitteln trifft unser Geschmackssinn.

Ein derzeit herrschendes Überangebot an Nahrung führt vermehrt zu einer erhöhten Aufnahme von Fett und Zucker. Dies führt nach wie vor zu einer steigenden Prävalenz an Übergewicht.

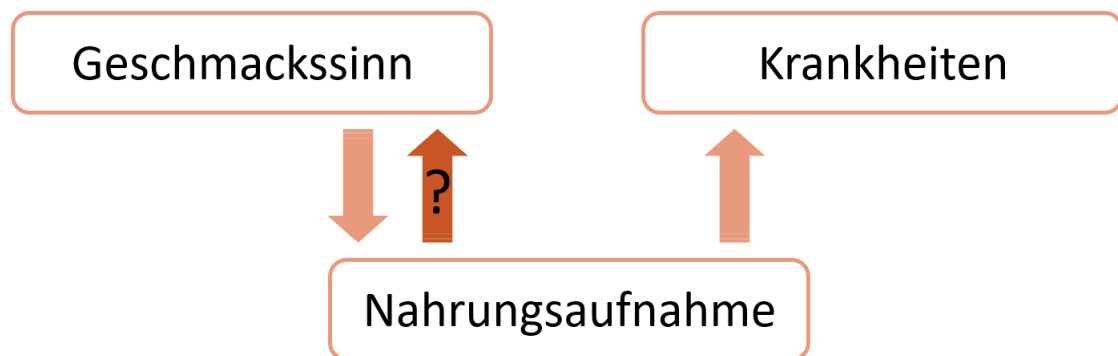


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zusammenhangs von Geschmackssinn, Nahrungsaufnahme und Krankheiten

Abbildung 5 veranschaulicht die bereits oben erläuterte Tatsache: Der Geschmackssinn hilft uns Lebensmittel auszuwählen. Bei einer übermäßigen Nahrungsaufnahme beziehungsweise einer dadurch vermehrten Zufuhr von Fett und Zucker können ernährungsbedingte Krankheiten entstehen. Bisher nicht vollständig geklärt ist, ob die Ernährung unseren Geschmackssinn und dadurch rückwirkend Nahrungsaufnahme und die Entstehung von Krankheiten beeinflusst.

Zu dieser Fragestellung wurden bisher einige mögliche Zusammenhänge genauer untersucht. In vielen Studien liegt das Hauptaugenmerk auf der Gabe von Zuckerlösungen [6, 92, 93].

Choo und Dando [6] untersuchten den Effekt einer Sucralosesupplementierung bei schwangeren Mäusen und die Auswirkung dieser auf den Geschmackssinn der Nachkommen. Weibliche Mäuse erhielten täglich eine genaue Menge an Wasser,

Saccharose-Lösung oder Sucralose-Lösung. Die verabreichten Dosierungen wurden basierend auf den täglich empfohlenen Mengen von 24 g Saccharose pro Tag für Frauen und 5 mg Sucralose pro kg Körpergewicht gewählt. Aus diesen täglich empfohlenen Mengen wurden die Dosierungen für die Versuchstiere extrapoliert. Eine Mäusegruppe erhielt 2 ml einer 0,623 M Saccharose-Lösung. Dies repräsentierte eine Aufnahme von 426,5 mg/kg pro Tag. Der zweiten Gruppe der Versuchstiere wurden täglich 2 ml einer 6,7 mM Sucraloselösung verabreicht, um eine Dosis von 5,331 mg/kg pro Tag zu erzielen. Dabei wurde den Mäusen über einen Zeitraum von vier Wochen vor der Schwangerschaft bis zwei Wochen nach der Schwangerschaft, insgesamt ca. 9 Wochen, eine der Lösungen verabreicht. Die Genexpression in Geschmackszellen der männlichen Nachkommen wurde mit Hilfe von quantitativer reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) analysiert. Diese Tiere erhielten direkt keine der Behandlungen. Zur Entfernung der *Circumvallate* Papille wurde ein Mix der Enzyme Dispase II [c = 2,5 mg/ml] und Collagenase Typ I [c = 1 mg/ml] verwendet, die RNA-Extraktion erfolgte direkt nach der Isolierung der Papille. Es wurde die Genexpression von verschiedenen Genen, unter anderem *T1R2*, *T1R3* und *GNAT3*, bestimmt. Die Ergebnisse zeigten keine Veränderung der Genexpression bei den untersuchten Genen, allerdings konnten signifikante Veränderungen in Bezug auf die Futter- und Wasseraufnahme der Saccharose- und Sucralose-Gruppen festgestellt werden. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Wasser) nahm die Saccharose-Gruppe signifikant mehr und die Sucralose-Gruppe signifikant weniger Futter und Wasser zu sich.

In der Studie von Zhao et al. [92] erhielten männliche und weibliche Ratten für zehn Wochen eine Saccharin-Lösung [c = 0,005 M/L] zusätzlich zu einer Standarddiät. Die Kontrollgruppe erhielt anstatt der Saccharin-Lösung Wasser. Es bestand ein freier Zugang zu Futter und Trinken, es gab keine fixe tägliche Dosis. Die Isolierung der Geschmacksknospen von der *Circumvallate* Papille erfolgte wiederum mit einem Enzymmix. Allerdings war der Mix eine Mischung von Elastase [c = 2 mg/ml] und Dispase [c = 2 mg/ml]. Mit Hilfe der RT-qPCR wurden die Expressionslevel der Gene der Rezeptoren des Heterodimers T1R2 und T1R3 genauer analysiert. Für T1R2 ergab sich durch die Aufnahme der Saccharin-Lösung, verglichen mit der Kontrollgruppe, keine signifikante Veränderung der Expressionslevel, weder einzeln betrachtet noch im Vergleich beider Geschlechter. Bei der Analyse der T1R3 mRNA Expression wurde, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, in der männlichen Gruppe eine signifikante höhere Genexpression ($p = 0,019$; $\alpha = 0,05$) festgestellt. In der weiblichen Gruppe konnte kein Unterschied der Behandlungen hinsichtlich der T1R3 mRNA Expression gefunden

werden. Es zeigte sich eine signifikante, geschlechterspezifische Verhaltensänderung. Männliche Ratten, welche Saccharin-Lösung bekommen hatten, zeigten eine signifikant höhere Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei weiblichen Ratten konnte dieser Effekt nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse implizieren einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten T1R3 Genexpression und einer erhöhten Nahrungsaufnahme bei der mit Saccharin behandelten Gruppe.

Aus den beiden angeführten Studien [6, 92] zeichnen sich interessante Resultate ab. In der Studie von Choo und Dando [6] führte die Gabe einer Saccharose- oder Sucraloselösung der Mutter bei den Nachkommen zu einer signifikant unterschiedlichen Aufnahme von Futter beziehungsweise Wasser. Die Nachkommen der Mäuse, die eine Saccharose-Lösung erhielten, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine erhöhte Aufnahme von Futter und Wasser. In der Studie von Zhao et al. [92] zeigte sich, neben einer Veränderung der Expression von T1R3, eine höhere Nahrungsaufnahme der männlichen Ratten. Durch die Nahrungsaufnahme wurde die mRNA Expression des GPCR T1R3 modifiziert wodurch rückwirkend die Nahrungsaufnahme beeinflusst wurde.

Chen et al. [93] untersuchten bereits 2010 den Einfluss einer differenten Fütterung auf die Genexpression in der *Circumvallate* Papille. Dabei wurden männliche Ratten in folgende Gruppen unterteilt: Eine Kontrollgruppe und eine Gruppe, die fettreiches Futter erhielt. Die dritte Gruppe erhielt eine Diät-Beschränkung, in der die Aufnahme an Standardfutter auf 50 % limitiert wurde. Die Fütterung erfolgte über einen Zeitraum von sechs Wochen. Die Genexpression von T1R2, T1R3 und GNAT3 wurde in Geschmackspapillen der *Circumvallate* Papille gemessen. Die Genexpressionswerte von T1R2 zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede abhängig von den Fütterungen, wohingegen die Expression von T1R3 gruppenspezifische Veränderungen aufwies. Bei der Gruppe, die fettreiche Nahrung erhalten hatten, wurde eine Herunterregulation von T1R3, im Vergleich zur Kontrollgruppe, festgestellt. Die Gruppe, die eine Diät Beschränkung bekommen hatte, zeigte im Vergleich mit der Gruppe, die fettreiche Nahrung erhielt eine Hinaufregulation des Gens GNAT3. Nach der Fütterungszeit von sechs Wochen wurde ein Präferenztest mit sechs verschiedenen Saccharinlösungen durchgeführt. Dabei wurden Saccharinkonzentrationen im Bereich von 0,001 M bis 0,4 M verwendet. Die Aufnahme der Saccharinlösungen war bei der Gruppe, die fettreiches Futter erhielt, im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Konzentrationen 0,01 M und 0,04 M signifikant geringer. Die Gruppe, die eine Diät-Beschränkung erhalten hatte, zeigte eine signifikante Erhöhung der Aufnahme von 0,04 M Saccharinlösung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem zeigte die Gruppe, die

eine Diät-Beschränkung erhalten hatte, eine signifikant erhöhte Aufnahme an 0,01 M, 0,02 M und 0,04 M Saccharinlösung im Vergleich mit der Gruppe, die fettreiches Futter erhalten hatte.

In dieser Studie [93] wurde der Effekt einer fetthaltigen Fütterung näher untersucht. Dabei zeigten sich neben einer Modifikation der Genexpressionslevel von T1R3 und GNAT3 ebenfalls eine Veränderung der Aufnahme an Saccharinlösung der Versuchstiere. Durch die Modifikation von Bestandteilen des Geschmackssinnes wurde evtl. die zukünftige Nahrungsaufnahme beeinflusst.

Kaufman et al. [3] führen eine Studie durch, um den Einfluss einer fetthaltigen Ernährung auf den Geschmackssinn zu analysieren. Dazu wurden männliche Mäuse acht Wochen entweder mit Standard Nagetierfutter (Kontrollgruppe) oder mit fetthaltigem Futter ernährt. Das Nagetierfutter hatte eine Zusammensetzung von 14 % Fett, 54 % Kohlenhydrate und 32 % Protein. Die fettreiche Fütterung bestand aus 58,4 % Fett, 26,6 % Kohlenhydraten und 15 % Protein. Nach der Fütterungsphase wurden die Genexpressionslevel der Geschmackszelltypen in der *Circumvallate* Papille genauer bestimmt. Dazu wurde die Expression von je einem Marker pro Zelltyp mittels RT-qPCR analysiert. Es wurden signifikant niedrigere relative Expressionen als in der Kontrollgruppe festgestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich eine verminderte Expression der Marker für Geschmackszelldifferenzierung (Ki-67), deren Entwicklung (β -Catenin) und eine verminderte Dichte von Pilzpapillen. Um zusätzlich einen Eindruck von einem eventuellen Verlust von Geschmacksknospen bei Menschen zu erhalten, wurden außerdem vier Jahre lang Fotos von Pilzpapillen und anthropometrische Daten von Studenten gesammelt. Durch die Messung des Nackenumfangs kann auf den Körperfettanteil geschlossen werden. Dabei zeigte sich eine negative Korrelation zwischen dem Nackenumfang und der Dichte von Pilzpapillen.

Kaufman et al. [3] zeigten somit eine Abnahme der Papillendichte bei Fütterung mit fettreicher Nahrung. Die Ergebnisse der Studie lassen vermuten, dass eine fettreiche Nahrung den Geschmackssinn beeinflussen könnte, wodurch rückwirkend die Prävalenz von Folgeerkrankungen steigen würde.

Zusammenfassend wurde daraus geschlossen, dass das Essverhalten den Geschmack von Nahrung beeinflussen könnte, wodurch wiederum das zukünftige Essverhalten verändert wird. Ein besseres Verständnis dieser Aspekte könnte dabei helfen, ernährungsbedingte Krankheiten durch den Überkonsum von Nahrung zu verhindern.

2. Die Fragestellung

Das Hauptziel der Arbeit war die Untersuchung der Fragestellung, ob eine hochkalorische Fütterung eine Veränderung der Expression von für die Geschmackswahrnehmung relevanten Genen in der *Circumvallate* Papille von Mäusen bewirken kann. Dieser Ansatz resultierte aus der Vermutung, dass eine hochkalorische Fütterung entsprechend westlicher Ernährungsformen die Genexpressionslevel von geschmacksrelevanten Genen beeinflusst. Durch Microarray Analysen wurde ein Überblick über das Transkriptom in der *Circumvallate* Papille der Maus gewonnen. Die Genexpression der verschiedenen Marker der Geschmackszelltypen wurden mit der quantitativen Real-Time-PCR analysiert. Um dies zu ermöglichen, war es zunächst Ziel der Arbeit, eine funktionierende Methode zu entwickeln, durch die es möglich ist, die RNA aus der *Circumvallate* Papille von gefrorenen Mäusezungen zu isolieren. Verschiedene Ansätze waren notwendig, um eine erfolgreiche Isolierung der RNA, die cDNA-Synthese dieser und reproduzierbare RT-qPCR Ergebnisse sicherzustellen.

Es ergaben sich folgende Arbeitsschritte:

- Zum Ersten sollte eine Methode zur Isolierung von RNA aus der *Circumvallate* Papille von gefrorenen Mäusezungen etabliert werden.
- In Folge dessen sollte die cDNA-Synthese und die RT-qPCR Bestimmung relevanter Gene optimiert werden.
- Das Hauptziel war die Genexpressionslevel geschmacksrelevanter Gene in der *Circumvallate* Papille von Mäusen in Abhängigkeit von verschiedenen Fütterungen näher zu analysieren.

Dies geschah (I) durch die Durchführung von je einem Microarray pro Fütterungsgruppe und (II) durch die Analyse verschiedener Marker mit der RT-qPCR bei jedem Versuchstier.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräte und Software	Hersteller
Abzugschrank	PVP Labortechnik GmbH
Auswertesoftware Fusion-CAPT	Vilber Lourmat GmbH
Autoklav Tuttnauer 3870ml	VWR International
C1000 Touch™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Eismaschine AF 80	Hubbard Systems Inc.
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
Fluoreszenzdetektor Fusion FX7	Vilber Lourmat GmbH
GenePix 4400 Microarray	Molecular Devices, LLC
GenePix® Pro Microarray Image Analysis Software	Molecular Devices, LLC
Geschirrspüler G7883	Miele
Heizblock, Analog Heatblock	VWR International
Microzentrifuge, 5415R	Eppendorf GmbH
Minizentrifuge Perfect Spin mini	Peqlab Biotechnologie GmbH
Plattenlesegerät, Infinite M200	Tecan Group Ltd.
Software Tecan iControl, Version 1.10.4.0	Tecan Group Ltd.
StepOnePlus, RT-qPCR	Applied Biosystems
Sterilwerkbank, BioStar Plus	Telstar
Trockenschrank DRY-Line	VWR International
Vakuumkonzentrator 5301	Eppendorf GmbH
Vortex	Phoenix Instrument GmbH
Wasseraufbereitungsanlage, arium® 611VF	Sartorius

3.1.2 Materialien

Materialien				Hersteller
1,5 ml	Sure-Lock	Microcentrifuge	Starlab International GmbH	
Reaktionsgefäß				
1,5 ml	Reaktionsgefäß	RNase, DNase & DNA frei	Starlab International GmbH	
96 Well	Platte, „Fast“	Typ, PCR	Biozym Biotech Trading GmbH	
BZO	Adhesive	Optical Seal Film	Biozym Biotech Trading GmbH	
Einmal-	Insulinspritze,	1ml, G 30 x 1/2"	B. Braun Melsungen AG	
Einweg-	handschuhe		Ansell	
Einweg-	pipette		Thermo Fisher Scientific	
Einweg-	pistill		VWR International	
Elektronische	Pipettierhilfe		Starlab International GmbH	
Fast SYBR™	Green Master Mix		Thermo Fisher Scientific	
Filterspitzen			Peqlab Biotechnologie GmbH	
High-Capacity	cDNA	Reverse	Thermo Fisher Scientific	
Transcription Kit				
Kolbenhub-	pipetten,	Research Plus in den	Eppendorf GmbH	
Größen	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl, 1000 µl			
Luna®	Universal qPCR Master Mix		New England BioLabs GmbH	
LunaScript™	RT SuperMix Kit		New England BioLabs GmbH	
MasterPure™	RNA Purification Kit		Epicentre	
MinElute	PCR Purification Kit		Qiagen N.V.	
Monarch®	Total RNA Miniprep Kit		New England BioLabs GmbH	

OneTaq® Hot Start 2X Master Mix	New England BioLabs GmbH
PCR Cooler	Eppendorf GmbH
Pipettenspitzen	Starlab International GmbH
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark International
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen N.V.
Rotizell®-Tissue-Tücher	Carl Roth GmbH + Co. KG
Secure-Seal-Hybridisierungskammer	Grace Bio Labs
Sterile Schere, Pinzette	
Styroporbox	

3.1.3 Reagenzien

Verwendete Chemikalien	Hersteller
≥ 96 % Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG
5' Cyanin 3 markiert, Nonamer	TriLink BioTechnologies, Inc.
DNA Ladefarbstoff (6X)	Thermo Fisher Scientific
DNA Leiter 1Kb	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)
Flüssiger Stickstoff; LD-25	VWR International
Nuklease-freies Wasser	Carl Roth GmbH + Co. KG
RiboRuler High Range RNA Leiter	Thermo Fisher Scientific
RNA Ladefarbstoff (2X)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)
RNAlater-ICE	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)
RNase™ AWAY	Molecular Bio-Products, inc.
Roti®-GelStain	Carl Roth GmbH + Co. KG
Roti®-Nukleinsäurefrei	Carl Roth GmbH + Co. KG
SuperScript III Reverse Transcriptases	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)
Universal Agarose, peqGOLD	VWR International

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer

Gen	Sequenz: Forward Primer, Reverse Primer	Produktgröße [bp]	Exon Span	Quelle
<i>18S</i>	CGGCTACCACATCCAAGGAA GCTGGAATTACCGCGGCT	187	Nein	[94]
<i>5HT3b</i>	CTGTCTACCTGGACCTTTGCG AACTCATCGTTCCAAACCTCTC	103	Ja	PB
<i>ACTB</i>	CCCTGTGCTGCTCACC GCACGATTTCCTCTCAG	328	Ja	[95]
<i>Car4</i>	TACGTGGCCCCCTCTACTG GCTGATTCTCCTTACAGGCTCC	115	Ja	PB
<i>Entpd2</i>	TGCGCCTAAACCTGAC CCCAGCCATACTTGATGAAGTT	183	Ja	PB
<i>GLUT1</i>	CAGTTCGGCTATAACACTGGTG GCCCCCGACAGAGAAGATG	156	Ja	PB
<i>GNAT3</i>	GCAACCACCTCCATTGTTCT AGAAGAGCCCACAGTCTTTGAG	286	Ja	[95]
<i>Hes6</i>	ACCACCTGCTAGAATCCATGC GCACCCGGTTTAGTTCAGC	210	Nein	PB
<i>HPRT</i>	GAGAGCGTTGGGCTTACCTC ATCGCTAATCACGACGCTGG	136	Ja	[96, 97]
<i>KCNQ1</i>	ATGCTCTGTGGTGGGGGGTG CTTCTGCCTCTGCTTCTGCTGG	185	Ja	[98]
<i>Ki67</i>	ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT GCTCGCCTTGATGGTTCCT	104	Ja	PB
<i>Krt8</i>	TACATCAACAACCTCCGCCG GCAACTCACGGATCTCCTCTT	188	Ja	SD
<i>PDE6b</i>	GCAGCACTTTTTGAACTGGTG CATTGCGCTGGCGGTACATA	136	Nein	PB
<i>Shh</i>	AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA TTCGGAGTTTCTTGTGATCTTCC	103	Nein	PB
<i>Slc1a3</i>	ACTGCTGTCATTGTGGGTACA ATAGACTACAGCGCGCATCC	213	Ja	SD

<i>Snap-25</i>	CAACTGGAACGCATTGAGGAA GGCCACTACTCCATCCTGATTAT	177	Ja	PB
<i>Sox2</i>	GCGGAGTGGAACTTTTGTCC CGGGAAGCGTGTACTTATCCTT	157	Nein	PB
<i>T1R2</i>	AAGCATCGCCTCCTACTCC GGCTGGCAACTCTTAGAACAC	114	Ja	[95]
<i>T1R3</i>	GAAGCATCCAGATGACTTCA GGGAACAGAAGGACACTGAG	283	Ja	[95]
<i>Tas2r104</i>	CAAAGGTTTTCTTCTGACTATGCT CAAACGCTCAGATGGTTAATAATTACC	91	Nein	[99]
<i>Tas2r106</i>	TATATGGTTTGCCACCAGCCT AGAGGTAAACCTGCCAGGAAA	215	Nein	SD
<i>Tas2r118</i>	CACCGGTGGAGACGATTCTC AAGTTGTATAGCATTGATGTCCACTGT	76	Nein	[99]
<i>Tas2r124</i>	CAATTCTAGAGGAGATAGAGACCCTAG TG AGCAAGAGGAAGGAGACCAAAA	78	Nein	[99]
<i>Tas2r130</i>	TGAAAGCCATGAAAGCAGTAATTT CTGGAGGTGGCTATGAGAAAGG	79	Nein	[99]

SD: selbst design; PB: Primer Bank;

3.2 Methoden

3.2.1 Mausstudie

Am Institut für Molekulare Biomedizin an der Comenius Universität Bratislava führte Jozef Čonka unter der Leitung von Prof. Dr. Katarína Šebeková eine Fütterungsstudie mit Mäusen im Rahmen seiner Doktorarbeit durch. Es wurden pro Hauptgruppe 25 männliche C75/BI6 Mäuse für 24 Wochen *ad libitum* mit einer Standarddiät oder hochkalorisch gefüttert. Die hochkalorische Fütterung bestand aus pelletiertem McDonald's-Futter. Es wurde zwischen sechs unterschiedlichen Fütterungen differenziert (Tabelle 2). Die Gruppen, die Cola als Getränk konsumierten, wurden in je zwei Untergruppen eingeteilt, wie in der folgenden Auflistung sichtbar. Es wurde zwischen sechs verschiedenen Gruppen differenziert. Die angegebenen Zahlen beziehen sich auf die Anzahl der Mäuse bei der Endpunktbestimmung.

Tabelle 2: Gruppenübersicht

Gruppennummer	Gruppenname	n	Verwendete Abkürzung
1	Kontrollfutter + Wasser	11	CTRL + Wasser
2	Kontrollfutter + Cola AT	7	CTRL + Cola AT
3	Kontrollfutter + Cola SK	12	CTRL + Cola SK
4	McDonald's + Wasser	8	MCD + Wasser
5	McDonald's + Cola AT	7	MCD + Cola AT
6	McDonald's + Cola SK	7	MCD + Cola SK

Die verschiedenen Fütterungen (CTRL vs. MCD bzw. Cola AT vs. Cola SK) wurden aufgrund deren unterschiedlichen Nährstoffzusammensetzung gewählt. Kontrollfutter bzw. Standardfutter besitzt einen geringen Fettanteil und einen weitaus geringeren Kaloriengehalt als McDonald's-Futter. Letzteres zeichnet sich vor allem aufgrund des hohen Fettgehaltes aus. Das Süßungsmittel der Gruppe Cola AT war Saccharose mit einem Glucose/Fructose Gehalt von 50:50. In der Gruppe Cola SK bestand das Süßungsmittel des Getränks aus einem Glucose-Fructose-Sirup mit einem Verhältnis von 56:44.

Die gesamten Zungen wurden den Mäusen nach der Fütterungsphase von 24 Wochen durch die Kooperationspartner der Comenius Universität Bratislava entnommen und bis zur weiteren Behandlung bei -80°C gelagert.

3.2.2 Gewebeaufarbeitung

Am Tag vor der Entfernung der Papille wurde der Arbeitsplatz zunächst mit in Ethanol getränkten Tüchern gesäubert. Sämtliche Werkzeuge, wie Scheren und Pinzetten, wurden vor der Benutzung abgeflammt. Die gefrorene Zunge wurde in kalter Umgebung in zwei Hälften geschnitten, die Zunge sollte dabei möglichst nicht auftauen. Der hintere Teil, auf dem sich die *Circumvallate Papillae* befindet, wurde für mindestens 16 Stunden bei -20°C in 500 µl RNAlater-ICE vor der weiteren Aufarbeitung eingelegt.

Der Arbeitsplatz und die Geräte wurden mit Hilfe von 70 % Ethanol und RNase™ AWAY gesäubert und 1,5 ml RNase, DNase & DNA freie Reaktionsgefäße wurden für die Überführung der *Circumvallate* Papille vorbereitet.

Im Anschluss wurde die RNA entweder mit dem Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs GmbH, England) oder dem MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre, USA) isoliert. Die hier verwendeten Bezeichnungen für Reagenzien sind Eigennamen des jeweiligen verwendeten Kits.

Im zuerst genannten Kit ist angeführt, dass pro Probe 300 µl des 1X DNA/RNA Schutzreagenz hinzuzufügen sind. Die 1:2 Verdünnung wurde vorab für alle Proben hergestellt, ein Überstand von 10 % wurde miteinkalkuliert. Laut Anleitung des MasterPure™ RNA Purification Kit erfolgt keine vorherige Einlegung in ein Schutzreagenz, es kann sofort mit der Zelllyse gestartet werden. Pro Probe wurde ein Lysepuffer vorbereitet, indem 300 µl der Gewebe- und Zelllyselösung mit 1 µl Proteinase [c = 50 µg/µl] in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt wurden.

Die Papille wurde präzise herausgeschnitten und in ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Das Gewebe wurde mit einem Kunststoffmörser aufgeschlossen und immer wieder mit flüssigem Stickstoff gefroren, bis nur mehr Pulver sichtbar war. 300 µl des 1X DNA/RNA Schutzreagenz oder 300 µl des Lysepuffers wurden zur Probe hinzugefügt, wobei das Pistill mit dem jeweiligen Mix abgespült wurde. Durch Auf- und Absaugen mit einer 1 ml Spritze (30 Gauge) wurde die Probe weiter zerkleinert. Die Proben wurden anschließend auf Eis gelagert, bis mit der RNA-Isolierung gestartet wurde.

3.2.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung mit dem MasterPure™RNA Purification Kit beruht auf dem Prinzip der Ausfällung mit Isopropanol. Bei dem Monarch® Total RNA Miniprep Kit wird die RNA an einer Säule adsorbiert, dabei werden unerwünschte Bestandteile entfernt und im Anschluss wird die RNA eluiert. Die aufgereinigte RNA wird im Anschluss für RT-qPCR Analysen verwendet. Die in den Punkten 3.2.3.1 und 3.2.3.2 verwendeten Bezeichnungen für Reagenzien sind Eigennamen des jeweiligen verwendeten Kits.

3.2.3.1 Durchführung mit MasterPure™RNA Purification Kit

Für die RNA-Isolierung bei der Methodenentwicklung wurde das MasterPure™RNA Purification Kit verwendet. Dabei wurden nur RNase, DNase & DNA freie Utensilien verwendet. Der Arbeitsbereich wurde zuvor mit RNase™ AWAY gereinigt. Des Weiteren wurde darauf geachtet, die Kontamination mit exogenen Ribonukleasen zu vermeiden.

Im Anschluss zur Gewebeaufarbeitung wurde die Probe 15 Minuten lang bei 65°C inkubiert, wobei diese alle fünf Minuten gut durchgemischt wurde. Anschließend wurde die Probe vier Minuten auf Eis abgekühlt. Damit die Nukleinsäuren von Proteinen in der Probe abgetrennt werden können, wurden der lysierten Probe 175 µl des MPC Proteinpräzipitation Reagenz hinzugefügt. Das Gemisch wurde zehn Sekunden im Vortex durchmischt und in der Microzentrifuge für zehn Minuten bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert, diese Einstellungen wurden bei jedem der folgenden Zentrifugationsschritte beibehalten. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, das Pellet wurde verworfen. Isopropanol wird für die Präzipitation der RNA hinzugefügt. Das Gemisch wurde 30-40 Mal geschwenkt und anschließend zentrifugiert, im Anschluss wurde das Isopropanol, ohne das Pellet zu beschädigen, wieder entfernt. Um kontaminierende DNA zu entfernen, wurden 200 µl der DNase I Lösung für die Probe vorbereitet, dazu wurden 5 µl der RNase freien DNase mit 1X DNase Puffer auf 200 µl verdünnt – 10 % Überstand wurden miteinberechnet. Nach dem Hinzufügen von 200 µl der hergestellten DNase I Lösung wurde bei 37°C 30 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden 200 µl von 2X T & C Lösung hinzugefügt und gründlich vermengt. Nach dem Zusatz von 200 µl MPC Protein Präzipitation Reagenz, wurde die Probe zehn Sekunden lang durchmischt, vier Minuten auf Eis abgekühlt und im Anschluss zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt, 30-40 Mal geschwenkt und

zentrifugiert. Anschließend wurde das Isopropanol, ohne das Pellet zu beschädigen, entfernt.

Um das Pellet zu reinigen, wurden 80 µl eines 70 % Ethanols in das Reaktionsgefäß pipettiert und einige Male auf- und abpipettiert. Das Ethanol wurde nach jedem Reinigungsschritt wieder mit einer Pipette entfernt. Zuletzt wurde die RNA mit 35 µl Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Ethylendiamintetraessigsäure (Tris-EDTA)-Puffer verdünnt. Die isolierte RNA wurde bis zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung auf Eis gelagert.

3.2.3.2 Durchführung mit Monarch® Total RNA Miniprep Kit

Die RNA der Studienproben wurde mit dem Monarch® Total RNA Miniprep Kit isoliert. Vor der Durchführung wurden der Arbeitsplatz und sämtliche Utensilien gereinigt. Die nicht im Kit enthaltenen Reaktionsgefäße waren RNase, DNase & DNA frei. Die Microzentrifuge wurde zu Beginn der Isolierung auf eine Geschwindigkeit von 16.000 x g bei Raumtemperatur eingestellt. Diese Einstellungen wurden während der gesamten RNA Isolierung nicht verändert. Außerdem wurde eine Heizplatte auf 55 °C vorgeheizt. Sämtliche Arbeitsschritte wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers für Gewebeproben durchgeführt:

Vor der Isolierung wurden die Puffer entsprechend vorbereitet. Die DNase I wurde mit 275 µl Nuklease-freiem Wasser (NFW) verdünnt, vorsichtig resuspendiert und im Anschluss bei -20 °C gelagert. Des Weiteren wurden 1,040 µl Proteinase K Resuspensionspuffer zur Proteinase K pipettiert, die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Zu den vorgelegten 25 ml des RNA Waschpufferkonzentrats wurden 100 ml eines 96 % Ethanols gegeben. Die Lagerung dessen und aller weiteren Reagenzien erfolgte bei Raumtemperatur.

Der erste Schritt der Isolierung, die Addition von 300 µl des 1X DNA/RNA Schutzreagenz, wurde bereits während der Gewebeaufarbeitung ausgeführt. Pro Probe wurden 30 µl des Proteinase K Reaktionspuffers und 15 µl der Proteinase K hinzugefügt. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben fünf Minuten bei 55 °C inkubiert. Die Proben wurden kurz gevortext und in der Microzentrifuge für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Überstand wurden 300 µl des Lysepuffers hinzugefügt, im Anschluss wurde das Gemisch kurz gevortext. Die im Kit enthaltenen und bereits beschrifteten Sammelröhrchen wurden mit

einer hellblauen Säule versehen. Der gesamte Inhalt wurde mit einer Pipette auf die Säule überführt und 30 Sekunden zentrifugiert, um das meiste der gDNA zu entfernen. Zum Durchfluss wurden 600 µl $\geq 96\%$ Ethanol hinzugefügt und mittels Auf- und Abpipettieren durchmischt. Das Gemisch wurde auf die vorbereiteten dunkelblauen Säulen aufgetragen, diese wurden mit einem neuen Sammelröhrchen versehen. Nachdem 30 Sekunden zentrifugiert wurde, wurde der Durchfluss verworfen und eine zusätzliche Entfernung von unerwünschter genomischer DNA wurde vorgenommen. Dazu wurden 500 µl RNA Waschpuffer auf die Säule aufgetragen. Im Anschluss wurde 30 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss wurde verworfen. In einem Reaktionsgefäß wurden pro Probe 5 µl DNase I mit 75 µl DNase I Reaktionspuffer vermischt, ein Überstand von 10 % wurde miteinkalkuliert. Pro Probe wurden 80 µl des Mixes direkt auf die Säule aufgetragen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss der Inkubation wurden 500 µl RNA Primingpuffer aufgetragen und 30 Sekunden lang zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Es wurden 500 µl des RNA Waschpuffers hinzupipettiert und wiederum 30 Sekunden zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Nach Auftragen von 500 µl des RNA Waschpuffers auf die Säule, wurde diese für zwei Minuten zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Spitze der Säule nicht mit dem Durchfluss in Berührung kam. 50 µl von NFW wurden direkt auf die Säule aufgetragen und für 30 Sekunden zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bis zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung auf Eis gelagert.

3.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch mit dem Tecan Reader (Tecan Group Ltd., Schweiz) mit Hilfe einer NanoQuant® Platte bestimmt. Der Blindwert wurde mit dem jeweiligen Lösungsmittel, Tris-EDTA-Puffer oder NFW gemessen. Im Anschluss wurden die Proben im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm, als Referenzwellenlänge wurden 280 nm gewählt.

Zusätzlich wurde durch die Software das Verhältnis von $A_{280/260}$ berechnet, dabei sollte das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Dadurch kann auf die Qualität der isolierten RNA geschlossen werden. Ist das Verhältnis kleiner als 1,8 kann dies auf Verunreinigungen durch Proteine oder aromatische Verbindungen hinweisen [100].

3.2.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese beruht auf dem Prinzip der reversen Transkription. Dabei wird die isolierte einzelsträngige RNA, durch das Enzym reverse Transkriptase (RT), umgeschrieben in doppelsträngige cDNA. Diese synthetisierte cDNA wird im nächsten Schritt mittels RT-qPCR analysiert [100].

Eine Überprüfung des Vorliegens von kontaminierender DNA erfolgt mit Hilfe einer Probe, die alle Reagenzien mit Ausnahme des Enzymes RT (Minus-RT) enthält. Eine erfolgreiche Amplifizierung der Minus-RT Probe in der RT-qPCR deutet auf kontaminierende DNA hin.

3.2.5.1 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Die durch das MasterPure[™]RNA Purification Kit (Epicentre, USA) erhaltene RNA wird in cDNA umgeschrieben. Dabei wurden zunächst alle Reagenzien auf Eis aufgetaut und anschließend zwei verschiedene Mastermixe hergestellt: Ein Mastermix mit RT und ein Mastermix ohne RT. Das Pipettierschema ist Tabelle 3 zu entnehmen. Zu der Angabe in Tabelle 3 wurde ein Überstand von 10 % einkalkuliert. Laut Herstellerprotokoll liegt die Maximalkonzentration der RNA bei 2000 ng/µl. Die RNA-Konzentration war aufgrund der Größe der *Circumvallate* Papille deutlich unter dem Maximalwert. Die RNA wurde deswegen mit Hilfe des Vakuumkonzentrators (Eppendorf GmbH, Deutschland) eingeeengt, sodass die gesamte isolierte RNA für die cDNA-Synthese verwendet werden konnte. In ein Well einer 96-Well Platte wurden 10 µl des jeweiligen Mastermixes und 10 µl der RNA pipettiert, es ergab sich ein Volumen von 20 µl pro Well. Nachdem die Platte mit einer Folie bedeckt wurde, wurde die Platte bei 141 x g eine Minute in der Zentrifuge 5804R zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich der gesamte Mix am Boden der Platte befand.

Tabelle 3: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

Reagenz	Volumen (µl)	
	Mit RT	Ohne RT
10X RT Puffer	2,0	2,0
25X dNTP Mix (100mM)	0,8	0,8
10X RT Random Primers	2,0	2,0
MultiScribe™ RT	1,0	-
RNase Inhibitor	1,0	1,0
NFW	3,2	4,2
Gesamtvolumen pro Reaktion	10,0	10,0

Die Synthese fand im C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) entsprechend dem in Tabelle 4 angeführten Temperaturprogramm statt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Tabelle 4: Temperaturprogramm des C1000 Touch™ Thermal Cycler bei der cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit

	Step 1: Prädenaturierung	Step 2: Primer- hybridisierung	Step 3: cDNA- Synthese	Step 4: Reaktions- abbruch
Temperatur (°C)	25	37	85	4
Zeit in Minuten	10	120	5	∞

3.2.5.2 LunaScript® RT SuperMix Kit

Mit diesem Kit wurde die durch das Monarch® Total RNA Miniprep Kit (New England BioLabs GmbH, England) erhaltene RNA in cDNA umgeschrieben. Das Kit umfasst bereits vorgefertigte Reaktionsmische, diese enthalten bereits alle für die Reaktion notwendigen Reagenzien. Dabei enthält ein Reaktionsmix das Enzym RT. Ein weiterer Reaktionsmix dient zur Überprüfung von kontaminierender DNA und enthält kein Enzym. Die beiden Mastermixe wurden auf Eis aufgetaut und im Anschluss nach dem in Tabelle 5 angegebenen Pipettierschema in eine 96-Well Platte pipettiert. Dabei ist der Mastermix mit RT für die cDNA-Synthese vorgesehen, ein weiterer, ohne RT, dient als Kontrolle in der RT-qPCR. Die Konzentration der eingesetzten RNA sollte 1 µg nicht überschreiten. Wie bei der Methodenentwicklung wurde auch bei den Studienproben die gesamte eluierte RNA mittels Vakuumkonzentrator (Eppendorf GmbH, Deutschland) ungefähr 15 Minuten eingengt. Eine Hälfte der aufkonzentrierten RNA wurde für die RT-qPCR Analyse eingesetzt und wie folgt in cDNA umgeschrieben. Die andere Hälfte wurde bei -80°C gelagert und wurde für die cDNA-Microarrays eingesetzt. Die RNA wurde in eine 96-Well Platte pipettiert, dazu wurden 4 µl des jeweiligen Mastermix pipettiert und mit NFW wird auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Durch Auf- und Abpipettieren der Pipette wurden die Reagenzien durchgemischt, mit einer Folie bedeckt und eine Minute bei 141 x g in der Zentrifuge 5804R zentrifugiert.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die cDNA-Synthese mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit

Reagenz	Volumen (µl)	
	Mit RT	Ohne RT
LunaScript RT SuperMix (5X)	4,0	-
No-RT Control Mix (5X)	-	4,0
RNA	Variabel	Variabel
NFW	Auffüllen bis 20,0 µl	
Gesamtvolumen	20,0	20,0

Die Synthese fand im C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) lt. dem in Tabelle 6 angeführten Temperaturprogramm statt. Die synthetisierte cDNA wurde 1:10 verdünnt und bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Tabelle 6: Temperaturprogramm des C1000 Touch™ Thermal Cycler bei der cDNA-Synthese mit dem LunaScript® RT SuperMix Kit

	Step 1: Primer-hybridisierung	Step 2: cDNA-Synthese	Step 3: Hitzeinaktivierung
Temperatur (°C)	25	55	95
Zeit in Minuten	2	10	1

3.2.6 Quantitative RT Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) Analyse

Eine RT-qPCR Analyse erfolgt immer nach denselben drei Schritten:

- Denaturierung
- Anlagerung
- Elongation

Im Denaturierungsschritt wird die doppelsträngige DNA in ihre zwei Einzelstränge aufgetrennt. Bei der Anlagerung lagern sich die beiden Primer (forward und reverse) an ihre komplementären Sequenzen am DNA-Strang an. Im Schritt der Elongation verlängert die thermostabile DNA-Polymerase den jeweiligen Strang durch den Einbau von Nukleotidbausteinen (dNTP), als Startpunkt dienen die zuvor angelagerten Primer. Dieser Zyklus wiederholt sich 45-mal.

Die quantitative Real Time PCR hat den Vorteil, dass die Bildung eines PCR-Produktes in Echtzeit erfasst werden kann. Dies geschieht in dieser Arbeit mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYBR® Green und Luna® Universal. Die Farbstoffe fluoreszieren, wenn diese an doppelsträngige DNA gebunden sind. Das Fluoreszenzsignal ist direkt proportional zur Menge an gebildetem PCR-Produkt. In diesen Messungen wird der C_T-Wert, oder auch Threshold-Cycle, der Proben bestimmt. Jener Zyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmalig vom unspezifischen Hintergrundsignal zu unterscheiden ist, wird C_T-Wert genannt [101]. Unter dem Rn-Wert wird das Verhältnis der Fluoreszenzintensität des verwendeten Farbstoffes zu dem Fluoreszenzsignal des passiven Referenzfarbstoffes verstanden. Die Basislinie

trennt das Hintergrundrauschen vom spezifischen Signal. Durch Abzug der Fluoreszenzintensität der Basislinie vom Rn-Wert wird der sogenannte ΔR_n -Wert erhalten. Die Auswertung der RT-qPCR erfolgt durch eine relative Quantifizierung mit den Referenzgenen *β -Aktin*, *18S*, *HPRT*.

Um die Spezifität der Primer zu überprüfen, wurde standardmäßig eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese ist vor allem bei Fluoreszenzfarbstoffen wichtig, da sich der Farbstoff in alle doppelsträngigen DNA-Stücke einlagern kann und so ein Fluoreszenzsignal liefert. Durch die Erhöhung der Temperatur denaturiert die doppelsträngige DNA, der Farbstoff wird frei und das Fluoreszenzsignal sinkt bzw. stoppt. Durch die Schmelzkurvenanalyse und der daraus errechneten Schmelztemperatur des PCR-Produktes kann zwischen spezifischem PCR-Produkt und evtl. unspezifischen Produkten oder Primer Dimeren unterschieden werden. Bei gelungener Amplifikation wird ein spezifischer Peak erhalten, wie in Abbildung 6 dargestellt [100, 101].

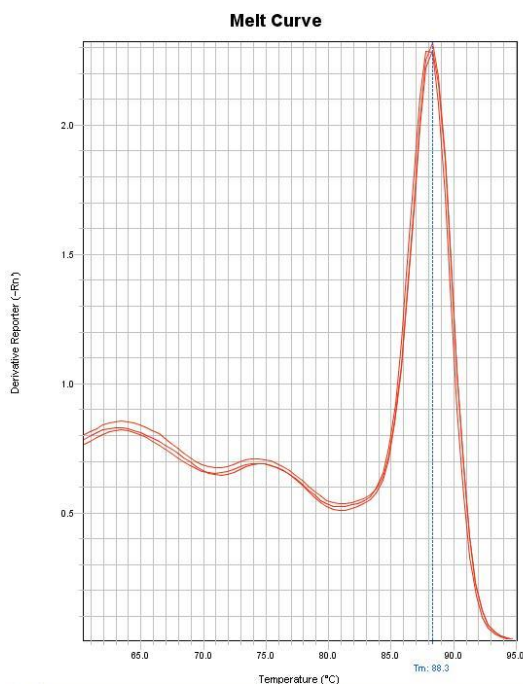


Abbildung 6: Beispiel einer Schmelzkurve bei gelungener Amplifikation (*β -Aktin*)

In dieser Arbeit wurde die quantitative Polymerasekettenreaktion mit Hilfe von zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Die Farbstoffe SYBR® Green und der Reaktionsmix Luna® Universal wurden in der Methodenentwicklung getestet. Bei der Messung der Studienproben wurde der Master Mix Luna® Universal verwendet. Dabei war der Ablauf der RT-qPCR immer gleich, lediglich die Temperaturprogramme unterschieden sich voneinander.

Um eine Nukleinsäurekontamination zu vermeiden, wurde zu Beginn des Experiments der Arbeitsplatz und sämtliche benötigte Materialien sorgfältig gereinigt. Benötigte Proben, Primer, Master Mix und NFW wurden auf Eis aufgetaut. Bei allen Messungen wurde stets ein Dreifachansatz durchgeführt. Die beiden verwendeten Master Mixe der Hersteller New England BioLabs GmbH (NEB) und Thermo Fisher Scientific enthalten bereits alle für die RT-qPCR benötigten Bestandteile: dNTPs, Puffer, DNA-Polymerasen und Mg^{+} -Ionen in Form von $Mg(Cl)_2$. Zunächst wurde der Reaktionsmix, bestehend aus dem Master Mix, Primern und NFW, mit einem Überstand von 10 % hergestellt. Nach dem ordentlichen Vermischen der Komponenten im Vortex wurden 29,7 µl des Mixes in die vorbereiteten Reaktionsgefäße pipettiert und mit 3,3 µl der zu messenden cDNA versehen. Der Reaktionsmix und die cDNA wurden im Vortex gut vermischt und mit Hilfe der Minizentrifuge am Boden des Eppendorf Reaktionsgefäßes gesammelt. Daraus wurden drei Mal je 10 µl in je ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Ein Blindwert, bestehend aus dem Reaktionsmix und NFW, wurde bei jeder pipettierten Platte und pro analysiertem Gen mitgemessen, um Verunreinigungen der Materialien auszuschließen. Zusätzlich wurde bei der Methodenetablierung eine Kontrollprobe ohne RT mitgemessen, um genomische DNA-Kontaminationen auszuschließen. Die fertig pipettierte Platte wurde mit einer optischen Versiegelungsfolie bedeckt und in der Zentrifuge 5804R bei 141 x g für eine Minute zentrifugiert, um den gesamten Inhalt eines Wells luftblasenfrei am Boden der Platte anzusammeln.

Die Messung der Fluoreszenz der gelabelten Proben erfolgte bei dem entsprechenden Temperaturprogramm. Das verwendete Programm bei der Methodenentwicklung ist in Tabelle 7 angeführt, das der Studienproben in Tabelle 8.

Tabelle 7: Temperaturprogramm mit dem Farbstoff SYBR® Green bei der Methodenentwicklung

	Temperatur	Zeit
Phase 1: Initiale Denaturierung	95°C	20 Sekunden
Phase 2: Wiederholender Zyklus (45-mal)	95°C	5 Sekunden
	58°C	40 Sekunden
Schmelzkurvenanalyse	95°C	15 Sekunden
	60°C	1 Minute
	Anstieg 0,5°C bis 95°C	

Tabelle 8: Temperaturprogramm mit dem Farbstoff Luna® Universal bei der Messung der Studienproben

	Temperatur	Zeit
Phase 1: Initiale Denaturierung	95°C	1 Minute
Phase 2: Wiederholender Zyklus (45-mal)	95°C	15 Sekunden
	60°C	30 Sekunden
Schmelzkurvenanalyse	95°C	15 Sekunden
	60°C	1 Minute
	Anstieg 0,5°C bis 95°C	

3.2.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Um die Spezifität der bisher nicht beschriebenen Primer zu überprüfen, wurde bei diesen das PCR-Produkt mittels MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) aufgereinigt und zur Firma Eurofins Genomics Germany GmbH für die Sequenzierung geschickt.

Da bei der Sequenzierung wiederholt Probleme auftraten, wenn die Polymerasekettenreaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt wurde, wurde

der Mastermix OneTaq® Hot Start verwendet. Der Arbeitsplatz und die benötigten Utensilien wurden zuvor mit dem Reagenz Roti®-Nukleinsäurefrei gesäubert.

Die Konzentration der Primer wurde jeweils auf eine Konzentration von 100 nM eingestellt. Es wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Das Pipettierschema ist in Tabelle 9 angegeben. Die Reagenzien wurden in einer 96-Well Platte vermischt, mit einer optischen Versiegelungsfolie bedeckt und bei 141 x g eine Minute lang in der Zentrifuge 5804R zentrifugiert. Die Platte wurde in den 1000 Touch™ Thermal Cycler platziert, das Temperaturprogramm wurde entsprechend der unten angeführten Tabelle 9 eingestellt und die Reaktion wurde gestartet.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Reaktionsmix der PCR mit dem Master Mix OneTaq® Hot Start

Reagenz	Volumen (µl)
OneTaq® Hot Start 2X Master Mix mit Standard Puffer	10,0
10 µM Forward Primer	0,2
10 µM Reverse Primer	0,2
Template DNA	2,5
NFW	7,1
Gesamtvolumen	20,0

Das Prinzip der Aufreinigung mit dem MinElute PCR Purification Kit beruht auf der Bindung der PCR-Produkte an eine Silica-Membran. Vor Verwendung des Kits wurden sämtliche darin enthaltenen Puffer, etc. lt. Herstelleranleitung verdünnt und aufbewahrt. Sammelröhrchen wurden mit einer Säule versehen. Die Microzentrifuge wurde bei Raumtemperatur auf eine Geschwindigkeit von 16.100 x g eingestellt, diese wurde während der Aufreinigung nicht verändert. Die hier verwendeten Bezeichnungen für Reagenzien sind Eigennamen des verwendeten Kits. In einem RNase, DNase & DNA freien Reaktionsgefäß wurden 15 µl des PCR-Produkts mit 75 µl PB Puffer vermischt

und auf die Säule aufgetragen. Es wurde eine Minute lang zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Nun wurden 750 µl PE Puffer auf die Säule aufgetragen. Nach drei Minuten Wartezeit wurde für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. 750 µl PE Puffer wurden auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert (ohne Wartezeit), der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit dem Sammelröhrchen für zwei Minuten zentrifugiert, um das restliche Ethanol zu entfernen. Das Sammelröhrchen wurde verworfen und die Säule wurde auf ein RNase, DNase & DNA freies Reaktionsgefäß aufgesetzt. Direkt auf die Säule wurden 15 µl NFW pipettiert. Nach einer Minute Wartezeit, wurde für eine Minute zentrifugiert, der Durchfluss wurde auf Eis gelagert.

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten cDNA wurden mit dem Tecan Reader und NanoQuant® Platten bestimmt. Dabei wurde ein Abgleich mit NFW durchgeführt und im Anschluss die Proben im Doppelansatz auf die Platte aufgetragen. Gemessen wurde die doppelsträngige DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm, als Referenzwellenlänge wurden 280 nm gewählt.

Pro zu sequenzierendem Primerpaar wurden zwei Safe-lock Reaktionsgefäße benötigt, für jeden Primer eines. Laut Sequenzierungsprotokoll von Eurofins Genomics Germany GmbH soll die Konzentration der PCR-Produkte 15 ng betragen. Zuvor wurde die Menge an NFW in einem Safe-lock Reaktionsgefäß vorgelegt, die für ein Gesamtvolumen von 15 µl notwendig ist. Die Menge an aufgereinigtem PCR-Produkt wurde hinzupipettiert und gut vermischt. In Reaktionsgefäß A wurden 2 µl des Reverse Primers pipettiert, in Reaktionsgefäß B 2 µl des Forward Primers. Nach gründlichem Vermischen wurden die Reaktionsgefäße an einer Sammelstelle aufgegeben und von Eurofins Genomics Germany GmbH sequenziert.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der Website des National Center for Biotechnology Information und dessen Tool Nukleotid Blast analysiert und die Sequenzen verglichen. Die von der Firma Eurofins erhaltene fasta-Datei mit der Sequenz des durch das Primerpaar amplifizierten Produktes wurde zum Abgleich der Sequenz ausgewählt.

3.2.8 Gelelektrophorese

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass geladene Teilchen in einem elektrischen Feld wandern. Die RNA und die DNA sind negativ geladen (Polyanion), sie bewegen sich in Richtung Anode. Geladene Moleküle werden während der Wanderung

im Gel, abhängig von der Porengröße, durch Reibungskräfte gebremst. Durch die Konzentration des Gels kann also die Porengröße und dadurch die Trennung beeinflusst werden [100, 101].

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde in der Methodenentwicklung mehrmals durchgeführt, dabei wurde ein Erfolg der RT-qPCR und die Aufreinigung überprüft. Der Ablauf der Gelelektrophorese erfolgt nach den Schritten:

- Ansetzen, Aufkochen und Gießen des Gels
- Auftragen der Proben
- Sichtbarmachen der Banden im Gel

Zunächst wurde eine 50X Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Stammlösung aus folgenden Reagenzien hergestellt: 246 g Tris, 57,1 ml Eisessig und 100 ml 0,5 M EDTA auf einen pH-Wert von 8 einstellen und mit ddH₂O auf 1L auffüllen. Das Agarosegel wurde mit 1X TAE-Puffer angesetzt, dieser wurde aus der 50X TAE-Stammlösung hergestellt. Abhängig vom Verwendungszweck des Agarosegels wurden unterschiedliche Gele hergestellt. Für ein 2,5 % Agarosegel wurden 3,5 g Agarosepulver und für ein 3,5 % Agarosegel wurden 4,9 g Agarosepulver mit jeweils 140 ml des 1X TAE-Puffers vermischt und samt dem Kolben abgewogen. Für ein 1,1-1,2 % Gel, welches bei den cDNA-Microarrays hergestellt wurde, wurden 1,5-1,7 g Agarosepulver mit 140 ml des 1X TAE-Puffers vermischt. Die Lösung wurde zwei Mal in der Mikrowelle aufgekocht, sodass es zu einer vollständigen Auflösung des Pulvers kam. Die gelöste Agarose wurde abgewogen und bis zum ursprünglichen Gewicht mit destilliertem Wasser aufgefüllt, um den Verlust des Wassers während des Erhitzens auszugleichen. Nach Abkühlen der Mixtur auf ca. 50°C wurden 8 µl des Fluoreszenzfarbstoffes hinzugefügt. Das Gel wurde in die vorbereitete Gießkammer gegossen und die Kämme positioniert. Nach dem Aushärten wurden die Kämme entfernt und das Gel wurde in der Elektrophoresekammer positioniert. Im Anschluss wurde die Kammer mit 1X TAE-Puffer befüllt. In die Taschen wurden 1,5 µl der DNA-Leiter 1 Kb (Invitrogen, USA) oder der RNA Leiter (Thermo Fisher Scientific, USA) pipettiert. Je 10 µl Probe wurden mit 2 µl eines DNA oder RNA Ladefarbstoffes vermischt und in die Tasche des Gels pipettiert.

Programmierung der Stromversorgung: 120 Volt, 200mA, 300 Watt; Laufzeit: 2 Stunden 30 Minuten

Die Auswertung des Gels erfolgte über einen Fluoreszenzdetektor direkt nach Ablauf der Elektrophorese. Dabei wurde mit Hilfe des Größenstandards die Größe der PCR-Produkte kontrolliert oder die Qualität der RNA oder DNA überprüft.

3.2.9 cDNA-Microarray

Die Anfertigung der Microarrays und die Messung dieser fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Mark Somoza statt.

Das Prinzip der Microarrays beruht auf den sog. Hybridisierungstechniken. Dabei werden bestimmte bekannte DNA- oder RNA-Sequenzen auf einem Objektträger in Form von Spots immobilisiert und mit zu untersuchenden, fluoreszenzmarkierten Nukleinsäuren hybridisiert. Es herrscht eine sehr hohe Spotdichte, da 10.000 bis 100.000 Moleküle pro cm² auf den Träger aufgetragen werden können. Dadurch werden mit einem Microarray wertvolle Informationen, über die in einer Probe exprimierten Gene erhalten [100, 101].

Die in Schritt 3.2.5.2 isolierte RNA wurde auf Eis aufgetaut und die Proben wurden gruppenspezifisch, lt. Liste im Anhang, zusammengeführt.

Zu Beginn wurde die Qualität der RNA mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurden je 2 µl einer Gruppe auf ein 1,1-1,2 % Gel aufgetragen. Der genaue Ablauf einer Agarose-Gelelektrophorese ist in Punkt 0 angeführt. Intakte RNA zeigt an der 18S- und der 28S-Bande der ribosomalen RNA deutlich getrennte Banden. Ein 1:2 Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten dieser Banden zeigt, dass die mRNA intakt und nicht degradiert ist.

Für das Umschreiben in cDNA wurde ein Reaktionsmix für sechs Gruppen, inkl. einem Überstand von 10 %, hergestellt, das Pipettierschema ist in Tabelle 10 angeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsmix für die Synthese der cDNA der Microarrays

Reagenz	Volumen (µl)
Strand Puffer	19,5
MgCl ₂	26,0
DTT	6,5
dNTP	6,5
RNase out	6,5
Gesamtvolumen	65,0

Die Konzentration der RNA wurde, wie in Punkt 3.2.4 beschrieben, bestimmt. Dabei wurde in jeder Gruppe die gleiche absolute RNA-Menge eingesetzt, um einen sinnvollen Vergleich der Gruppen zu erzielen. Das Volumen wurde mit einem Vakuumkonzentrator (Eppendorf GmbH, Deutschland) auf 4,5 µl eingengt. In einer 96-Well Platte wurden zuerst RNA und 12,5 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Cy3 (TriLink BioTechnologies, Inc.) miteinander vermischt. Zu den 17 µl wurden 10 µl des Reaktionsmixes und 3 µl SuperScript III pipettiert, vermischt, mit einer optischen Versiegelungsfolie abgedeckt und bei 141 x g für eine Minute in der Zentrifuge 5804R zentrifugiert. Die Markierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff und das Umschreiben der RNA in cDNA erfolgte im Thermocycler bei folgendem Temperaturprogramm: bei 25°C für fünf Minuten und bei 46°C für drei Stunden.

Je 30 µl eines Gemisches von NaOH (200nM) und EDTA (20nM) wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt, um einen basischen pH-Wert der cDNA zu erzielen. Die cDNA wurde hinzupipettiert, gut vermischt und für zehn Minuten bei 65°C am Heizblock erhitzt. Nach Hinzufügen von 60 µl 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (1 M) war der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Aufreinigung wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Deutschland) durchgeführt. Vor Verwendung des Kits wurden sämtliche darin enthaltenen Puffer, etc. lt. Herstelleranleitung verdünnt und aufbewahrt. Sammelröhrchen wurden mit einer Säule versehen. Die Microzentrifuge wurde bei Raumtemperatur auf eine Geschwindigkeit von 16.100 x g eingestellt, diese wurde während der Aufreinigung nicht verändert. Zu jedem der sechs Reaktionsgefäße wurden 600 µl des PB Puffers pipettiert, gut vermischt, auf die vorbereiteten Säulen aufgetragen und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, auf die Säule wurden 750 µl PE Puffer aufgetragen und nach Zentrifugation für eine Minute, wurde der Durchfluss wiederum verworfen. Um den restlichen Puffer zu entfernen, wurde die Säule für zwei Minuten zentrifugiert. Das Sammelröhrchen wurde durch ein RNase, DNase & DNA freies Reaktionsgefäß ersetzt. Auf die Säule wurden 50 µl NFW aufgetragen. Nach einer Minute Einwirkzeit, wurde das aufgereinigte Produkt durch Zentrifugieren in das Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert. Um ein höheres Volumen zu erreichen, wurde die eluierte cDNA mit 53 µl NFW verdünnt.

Die so mit Cy3-markierten cDNA-Proben wurden Dipl.-Ing. Dominik Ameur (Institut für Anorganische Chemie, AG Mark Somoza) übergeben, der die weiteren Schritte des Microarrays durchführte, die mit Hilfe der sogenannten „maskless-synthesis“

entsprechend der Arbeiten von Singh-Gasson et al. [102] und Agbavwe et al. [103] hergestellt wurden.

Die so mit Cy3-gelabelten cDNA-Proben wurden auf die Microarrays aufgetragen. Im Anschluss wurden die Microarrays mit einer Hybridisierungskammer (Grace Bio Labs, USA) abgedichtet. Die Hybridisierung der Microarrays erfolgte 22 Stunden bei 42°C in einer Lösung, die aus folgenden Reagenzien bestand: 100 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), 1 M Na⁺, 20 mM EDTA, 0,01 % Polysorbat-20 (Tween-20) und 0,06 % (w/v) Bovines Serumalbumin. Nach 22 Stunden Inkubation wurde die Klebefolie entfernt und die Microarrays mit drei Waschpuffern gewaschen. Mit dem ersten Waschpuffer, der aus Salz-Natrium-Phosphat-EDTA (SSPE), 900 mM NaCl, 60 mM Phosphat, 6 mM EDTA, 0,01 % Tween-20 bestand, wurden die Arrays je zwei Minuten gewaschen. Mit dem zweiten Puffer, der aus 100 mM MES, 100 mM NaCl, 0,01 % Tween-20 bestand, eine Minute und mit dem Dritten (0,1X Salzlösung-Natriumcitrat) für zehn Sekunden.

Die Microarrays wurden in einer Microarray-Zentrifuge getrocknet und mit Hilfe des Axon GenePix 4400 Microarray Scanners (Molecular Devices LLC., USA) gescannt. Durch die Nimble Scan Software wurde die Fluoreszenzintensität der Spots bestimmt und die Arrays wurden im Anschluss mittels Robust Multichip Averaging (RMA) aufeinander normalisiert. Die Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz erfolgte durch Negativkontrollen am Microarray. Dabei handelt es sich um bestimmte Stellen am Microarray, an denen keine cDNA-Sequenzen immobilisiert worden sind. Mit Excel wurde die x-fache Änderung der Fluoreszenzintensitäten kalkuliert. Als Schwellenwerte wurde eine x-fache Änderung größer gleich 1,5 und eine x-fache Änderung kleiner gleich 0,5 festgelegt. Eine Über- oder Unterschreitung der Werte galt als Indikator einer Genregulation.

3.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit Microsoft Excel (Version 1911) und der Statistiksoftware GraphPad Prism (Version 8.2.1).

Auswertung der Microarrays

Die erhaltenen Microarray Daten wurden mit NimbleScan normalisiert und in Microsoft Excel eingelesen. Die x-fachen Änderungen der sechs Fütterungsgruppen wurden durch Bezug auf die Gruppe CTRL + Wasser berechnet.

Auswertung der RT-qPCR Daten

Die erhaltenen Amplifikationsdaten wurden zunächst in die LinReg Software (Version 2018.0) eingelesen. Um jede Probe zu messen, wurden pro Gen zwei PCR-Platten benötigt. Aufgrund dessen, wurden die qPCR Daten eines Gens, welche von zwei unterschiedlichen Platten stammten, mit der Software Factor qPCR (Version 2016.0) normalisiert. Dabei wurde mit den N0-Werten gearbeitet. Dieser errechnet sich aus

$$N0 = \frac{Threshold}{Mean\ PCR-Efficiency^{Cq}}$$

Pro Probe wurde das geometrische Mittel von drei Referenzgenen (*ACTB*, *HPRT*, *18S*) gebildet. Daraus ergaben sich, durch Bezug aller weiteren gemessenen Gene auf die geometrischen Mittelwerte der Referenzgene pro Probe, relativ normalisierte Mittelwerte. Zusätzlich wurden die relativ normalisierten Mittelwerte auf die Gruppe CTRL + Wasser normalisiert, wodurch die mittlere x-fachen Änderung kalkuliert wurde.

Vor der statistischen Analyse wurde der Ausreißertest nach ROUT ($Q = 1\%$) durchgeführt. Es wurde pro Gen eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Außerdem wurde, nach dem Ausreißertest, bei den unterschiedlichen Zelltypen jeweils das geometrische Mittel der beiden gemessenen Marker gebildet und ebenfalls eine einfaktorielle ANOVA durchgeführt. Zusätzlich zur einfaktoriellen ANOVA wurde der Brown-Forsythe und Bartlett's Test durchgeführt. Signifikanzen wurden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$) und **** ($p \leq 0,0001$) gekennzeichnet.

Korrelationsanalyse

Mit den geometrischen Mitteln der verschiedenen Geschmackszelltypen (siehe 3.2.10, Auswertung RT-qPCR Daten) und den bestimmten Markern hinsichtlich Körperzusammensetzung, -gewicht und Stoffwechselmarker wurde eine Pearson Korrelationsanalyse durchgeführt. Dabei zeigt +1 einen positiven Zusammenhang und -1 einen negativen Zusammenhang zwischen Marker/Gen.

4. Ergebnisse

Zunächst wurde eine Methode entwickelt, durch die es möglich ist, aus der *Circumvallata* Papille von gefrorenen Mäusezungen die RNA zu isolieren. Das Ziel der Arbeit war es, die Genexpressionslevel von Markern für die verschiedenen Zelltypen einer Geschmacksknospe mit Hilfe von maßgeschneiderten cDNA-Microarrays sowie der RT-qPCR zu analysieren.

4.1 Methodenetablierung

Im ersten Teil der Ergebnisse ist die Etablierung der Methode zu finden. Es wurden die Gewebeaufarbeitung und verschiedene Parameter der RT-qPCR optimiert. Zusätzlich wurden unterschiedliche RNA-Isolierungs- und cDNA-Synthese Kits getestet, um dadurch die bestmöglichen Ergebnisse zu erzielen. Diese Schritte wurden mit Markern der Typ II Zellen – *T1R2*, *T1R3*, *GNAT3* – und dem Referenzgen *ACTB* etabliert. Die Konzentrationen der anderen Primer wurden mit der vollständig etablierten Methode optimiert. Sämtliche Parameter wurden bei Probezungen mit Hilfe der RT-qPCR getestet und dadurch optimiert. Die vollständig etablierte Methode wurde drei Mal mit Probemäusezungen durchgeführt, um reproduzierbare Ergebnisse sicherzustellen. Diese Arbeitsschritte werden in dem Punkt 3.2 zusammengefasst.

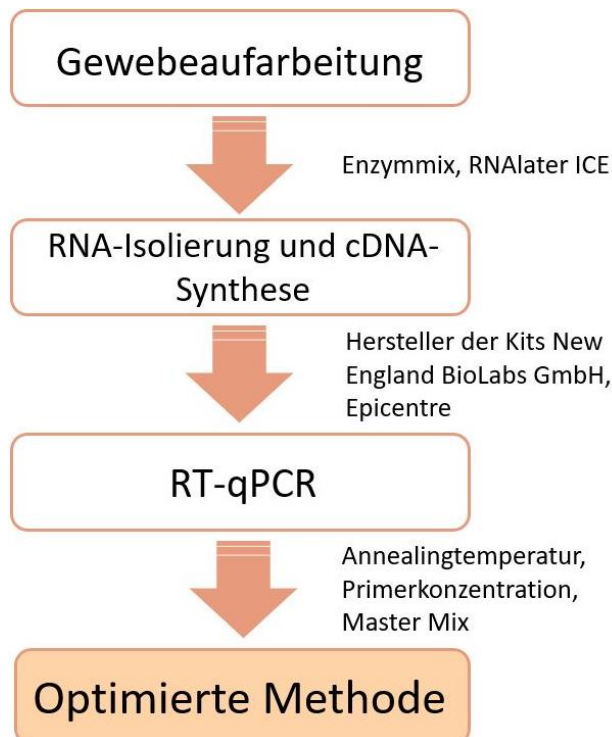


Abbildung 7: In der Methodenentwicklung optimierte Arbeitsschritte

4.1.1 Gewebeaufarbeitung

Zur Optimierung der Gewebeaufarbeitung wurden unterschiedliche Ansätze getestet. Für die Entfernung der *Circumvallate* Papille wurden bekannte Techniken angewandt. Dazu zählt die Verwendung eines Enzymmix der in den Zwischenraum von Epithel und Muskel eingespritzt wird, um eine Entfernung der Papille zu ermöglichen [3, 6, 92, 93]. Mittels RT-qPCR wurde die Expression von geschmackszellspezifischen (*T1R2*, *T1R3*, *GNAT3*) und allgemeinen mRNA Molekülen (*ACTB*) in den Proben überprüft. Durch den Vergleich der jeweiligen Konzentrationen konnte festgestellt werden, inwieweit die verschiedenen Techniken und Optimierungsschritte in der Gewebeaufarbeitung erfolgreich waren.

Enzymmix

Auf Basis publizierter Protokolle [3, 6, 92, 93] zur Gewinnung der RNA aus der *Circumvallate* Papille der Zunge von Mäusen wurde ein Enzymmix eingesetzt, um das Epithel der Zunge vom Muskel abzulösen. Diese Maßnahme soll es erleichtern, die Papille einfacher aus der Zunge herauszuschneiden. Dafür wurde eine Mischung der Enzyme Dispase [$c = 20 \text{ mg/ml}$] und Kollagenase [$c = 10 \text{ mg/ml}$] verwendet. Dabei wird der Enzymmix mit einer Spritze in den Zwischenraum zwischen Epithel und Muskel eingespritzt. Die Messung der RNA-Konzentration in der *Circumvallate* Papille zeigte erste Erkenntnisse: Bei der Aufarbeitung mit dem Enzymmix lag die Konzentration der RNA bei $18,04 \text{ ng/}\mu\text{l}$. Bei der Zunge, bei der kein Enzymmix verwendet wurde, war die Konzentration mit $57,96 \text{ ng/}\mu\text{l}$ um das Dreifache höher.

Durch die Verwendung des Enzymmixes bei der Gewebeaufarbeitung wurde bei dem Referenzgen *β -Aktin* ein C_T -Wert von $35,39 \pm 0,73$ ermittelt. Bei den Genen *T1R2*, *T1R3* und *GNAT3* kam es zu keiner Amplifikation, weshalb kein C_T -Wert ermittelt werden konnte. Das Weglassen des Enzymmixes bewirkte, dass eine erfolgreiche Amplifikation bei der RT-qPCR stattfand, wie in Abbildung 8 anhand des Gens *T1R2* dargestellt. Es ergaben sich folgende C_T -Werte bei einer Gewebeaufarbeitung ohne Verwendung des Enzymmixes: $34,07 \pm 0,17$ (*T1R2*), $30,15 \pm 0,24$ (*T1R3*), $38,63 \pm 0,25$ (*GNAT3*) und $26,10 \pm 0,18$ (*ACTB*).

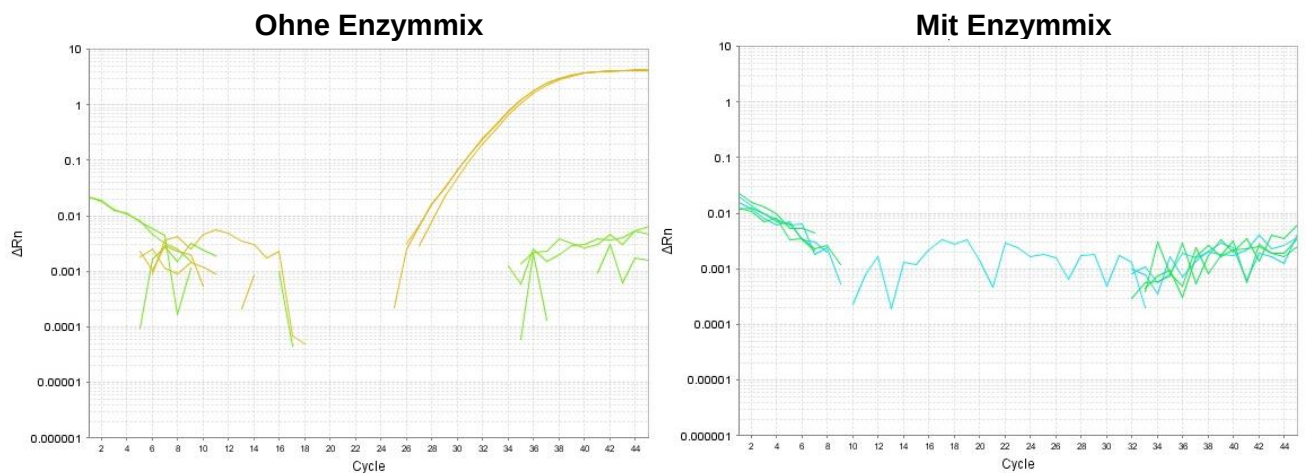


Abbildung 8: RT-qPCR Amplifikationskurven mit reverse Transkriptase (links gelb, rechts blau) und ohne reverse Transkriptase (links hellgrün, rechts dunkelgrün) von *T1R2* von unterschiedlich aufgearbeiteten Gewebeproben

Beide Diagramme zeigen jeweils typische Amplifikationskurven von Proben, deren cDNA-Synthese mit reverse Transkriptase (links gelb und rechts blau) und zur Kontrolle der genomischen DNA ohne reverse Transkriptase (links hellgrün und rechts dunkelgrün) durchgeführt wurden. Die linke Abbildung zeigt das Ergebnis für eine CV-Gewebeprobe, die ohne Enzymmix aufgearbeitet wurde, die rechte Abbildung das Ergebnis für die Gewebeaufarbeitung mit Verwendung des Enzymmix. Auf der Abszisse ist die Zykluszahl ($n = 45$) und auf der Ordinate der ΔRn Wert angegeben. Alle Proben wurden im Dreifachansatz gemessen.

Zur Kontrolle der genomischen DNA wurde zusätzlich eine Probe ohne RT mitgemessen. Bei beiden Gewebeaufarbeitungen war eine Amplifikation dieser Probe nur bei *ACTB* möglich. Die Probe, bei der in der Gewebeaufarbeitung ein Enzymmix eingesetzt worden war, hatte einen C_T -Wert von $37,87 \pm 3,85$. Die Gewebeaufarbeitung ohne Enzymmix ergab bei der Kontrollprobe einen C_T -Wert von $33,12 \pm 0,51$.

Verwendung von RNAlater-ICE

RNAlater-ICE ist ein Reagenz zur RNA-Stabilisierung. Mittels Diffusion gelangt es in das Gewebe der Probe und kann so zelluläre RNasen inaktivieren.

Nach dem Tod der Maus sollte die Gewebeentnahme und die RNA-Isolierung so rasch wie möglich erfolgen. Dies war vorliegender Arbeit nicht möglich, da die Proben nach der Gewebeentnahme bei -80°C eingefroren worden waren. Bei gefrorenen Proben kann

es zu dem Problem kommen, dass diese zu langsam auftauen und dadurch eine vollständige Inaktivierung von RNasen durch RNAlater nicht möglich ist [101].

Durch die Verwendung von RNAlater-ICE kann dies verhindert werden. Die gefrorenen Proben wurden in das vorgekühlte Reagenz eingelegt und bei -20°C für mindestens 16 Stunden gelagert, bis mit der Isolierung fortgefahren wurde.

Nach Isolierung der RNA zeigte die Messung der RNA Konzentration der *Circumvallate* Papille von drei Zungen, die mit RNAlater-ICE behandelt worden war, eine mittlere Konzentration von $80,97 \pm 36,22$ ng/μl. Der Mittelwert der Konzentration von drei nicht eingelegten Zungen lag bei $34,32 \pm 6,47$ ng/μl. Der statistische Vergleich der RNA-Konzentrationen, wobei drei Zungen zuvor in das Reagenz RNAlater-ICE eingelegt worden sind und drei nicht damit behandelt worden sind, zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,140$; $\alpha = 0,05$; $n = 3$). Im Anschluss wurde eine RT-qPCR durchgeführt, welche bei den Genen *T1R2*, *T1R3*, *GNAT3* und *ACTB* stabile Fluoreszenzwerte zeigte: $34,07 \pm 0,17$ (*T1R2*), $30,15 \pm 0,24$ (*T1R3*), $38,63 \pm 0,25$ (*GNAT3*), $26,10 \pm 0,18$ (*ACTB*). Zur Kontrolle der genomischen DNA wurde zusätzlich eine Probe ohne RT mitgemessen. Eine Amplifikation der Proben war nur bei dem Gen *ACTB* möglich.

4.1.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Nach Optimierung der oben genannten Parameter wurden diese mit dem zwei Stufen System für die RT-qPCR des Herstellers NEB getestet. Unter dem zwei Stufen System wird verstanden, dass zuerst die cDNA synthetisiert wird und im Anschluss daran, die RT-qPCR durchgeführt wird.

In den ersten Schritten zeigte sich eine Zeitersparnis durch Verwendung dieser Kits. Bei der RNA-Isolierung mit diesem Kit wird die RNA an einer Säule adsorbiert. Dadurch gab es sehr kurze Wartezeiten bei den Zentrifugationsschritten. Bei der Synthese der cDNA wurde ein bereits vorgefertigter Reaktionsmix, der alle benötigten Bestandteile enthält, hinzupipettiert. Das Temperaturprogramm des Thermocyclers (siehe Tabelle 6) benötigte ca. 15 Minuten. Verglichen mit der RNA-Isolierung mit dem Kit von Epicentre ergab sich eine ca. zehnfach niedrigere Konzentration. Die mittlere Konzentration der isolierten RNA – inklusive Verwendung von RNAlater-ICE – betrug 14,92 ng/μl. Bei Verwendung des Luna Universal qPCR Master Mix wurden, verglichen mit anderen Kits, neben niedrigeren C_T-Werten vermehrt negative Kontrollproben erhalten (siehe

Abbildung 9). Bei der Aufarbeitung mit den Kits von NEB gab es keine Kontamination mit genomischer DNA.

Die NEB-Kits wurden mit den bereits getesteten Kits kombiniert und variiert. Zum Beispiel wurde die RNA-Isolierung mit dem MasterPure™ RNA Purification Kit (Epicentre, USA) durchgeführt, die cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit (Epicentre, USA) und die RT-qPCR mit dem Luna Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs GmbH, England). Weiters wurde eine Kombination von RNA-Isolierung und cDNA-Synthese mit den NEB-Kits und der SYBR Green Master Mix geprüft.

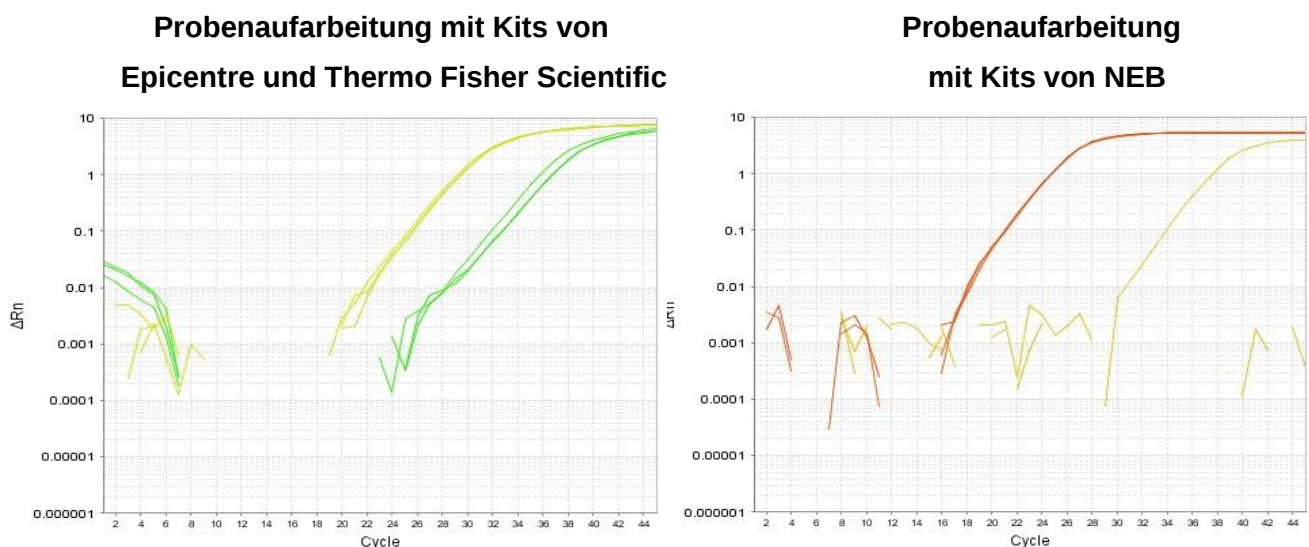


Abbildung 9: RT-qPCR Amplifikationskurven mit reverser Transkriptase (links gelb, rechts rot) und ohne reverse Transkriptase (links grün, rechts gelb) von β -Aktin von differentiellen Probenaufarbeitungen

Beide Diagramme zeigen jeweils typische Amplifikationskurven von Proben, deren cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase (links gelb und rechts rot) und zur Kontrolle der genomischen DNA ohne reverse Transkriptase (links grün und rechts gelb) durchgeführt wurden. Die linke Abbildung zeigt das Ergebnis für eine Gewebeprobe der *Circumvallata* Papille, bei der die RNA-Isolierung mit dem MasterPure™ RNA Purification Kit von Epicentre, die cDNA-Synthese mit dem High-Capacity cDNA RT Kit von Thermo Fisher Scientific und die RT-qPCR mit dem SYBR® Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt wurde. Die rechte Grafik zeigt diese Schritte mit Kits des Herstellers NEB. Auf der Abzisse ist die Zykluszahl ($n = 45$) und auf der Ordinate der ΔRn Wert. Alle Proben wurden im Dreifachansatz gemessen.

4.1.3 Optimierung der RT-qPCR

Annealingtemperatur

Mit Hilfe eines Temperaturgradienten wurde die optimale Annealingtemperatur ermittelt. Es wurde eine Polymerasekettenreaktion mit einem Gradienten von 62,1°C – 60,2°C – 58,0°C – 56,1°C durchgeführt. Diese wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese ausgewertet. Dabei wurden jeweils eine Nullprobe, eine Probe (RT+) und eine Kontrollprobe (RT-) für genomische DNA im Vierfachansatz aufgetragen.

Es wurden die Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte von *T1R2*, *T1R3*, *GNAT3* und *ACTB* gemessen. Dabei zeigten sich für die Erzielung maximaler Fluoreszenzintensitäten unterschiedliche Temperaturoptima, wie in Abbildung 10 anhand der PCR-Produkte von *T1R3* und *GNAT3* zu sehen ist. In der linken Grafik zeigt sich bei der Temperatur von 58,0°C die höchste Fluoreszenzintensität. Die PCR-Produkte von *GNAT3* zeigen bei der Annealingtemperatur von 60,2°C das höchste Signal.

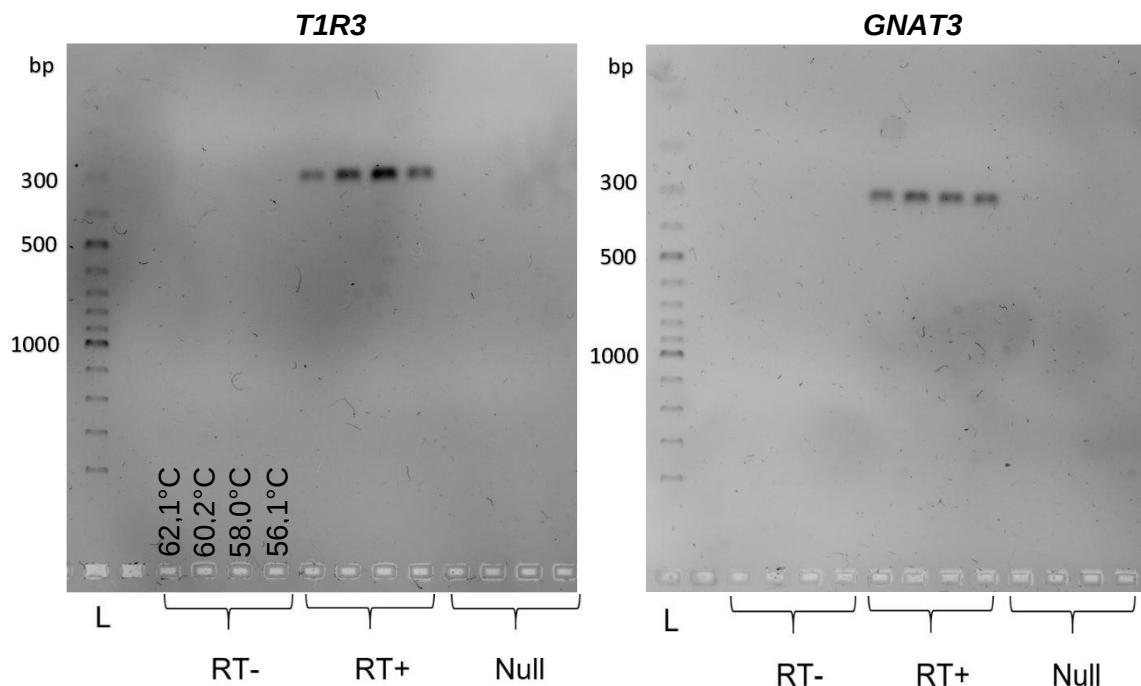


Abbildung 10: Gelelektrophorese der PCR-Produkte von *T1R3* und *GNAT3*

Abgebildet sind PCR-Produkte, die bei unterschiedlichen Annealingtemperaturen amplifiziert wurden. In beiden Bildern ist der Gradient jeweils von links nach rechts folgenderweise aufgetragen: 62,1°C, 60,2°C, 58,0°C, 56,1°C. Im linken Bild ist die Zuordnung der Temperaturen veranschaulicht. **L** = DNA/RNA-Leiter, Größenstandard [bp], **RT-** = cDNA-Synthese ohne reverser Transkriptase, **RT+** = cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase, **Null** = Nullprobe, ohne cDNA.

Spezifität der Primer

Bei der Auswahl der Primer und deren Konzentrationsanpassung wurde besonders auf die Spezifität geachtet. Neben der Analyse der C_T -Werte von Proben und Kontrollproben und deren Amplifikationskurven wurde, um die Spezifität zu prüfen, bei jeder Messung eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Aufgrund der spezifischen Schmelztemperatur eines PCR-Produkts sind durch die Analyse diese von unerwünschten Nebenprodukten, wie zum Beispiel Primer-Dimere differenzierbar. Bei noch nicht etablierten Primern wurden außerdem die Amplikonlängen mittels Gelelektrophorese überprüft.

Die Methodenetablierung diente unter anderem dazu, die optimale Konzentration der Primer zu ermitteln. Dabei sollte die Kontrollprobe (RT-) entweder mindestens fünf Zyklen Abstand von der cDNA-Probe mit RT aufweisen oder nicht sichtbar sein. Eine negative Nullprobe galt bei allen Messungen als Voraussetzung.

Sämtliche Primer wurden zuerst mit einer Konzentration von 100 nM getestet. Bei zufriedenstellender Amplifikation und Spezifität der Primer wurde diese Konzentration beibehalten. Von einer zufriedenstellenden Amplifikation wurde gesprochen, wenn die PCR-Effizienz einen Wert von $> 1,8$ erreichte, der C_T -Wert nicht größer als 30 war oder die RT-qPCR ihre Plateauphase erreichte.

In Abbildung 11 (siehe S.55) sind die gemessenen Konzentrationen von *Snap-25* und der dabei erhaltene C_T -Wert gezeigt. In der ersten RT-qPCR Messung wurde mit einer Konzentration von 100 nM gemessen. Hier zeigte sich ein mittlerer C_T -Wert von 37,39 mit einer Standardabweichung von 1,42. Aufgrund dieses hohen C_T -Wertes und negativer Null- und Kontrollprobe, wurden außerdem die Primerkonzentrationen 200 nM und 500 nM getestet. Bei einer Konzentration von 200 nM ergab sich ein C_T -Wert von $38,05 \pm 2,51$. Im Vergleich zur ersten Messung kam es zu einer höheren Standardabweichung und einer positiven Nullprobe. Bei der Konzentration von 500 nM wurde, im Vergleich zu den anderen Messungen, mit $34,77 \pm 0,13$ der geringste C_T -Wert und die kleinste Standardabweichung, gemessen. Die Null- und die Kontrollprobe waren negativ.

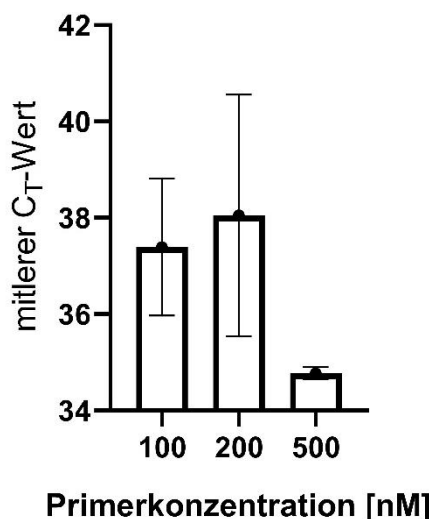


Abbildung 11: Optimierung der Primerkonzentration von *Snap-25*

Der Mittelwert der gemessenen C_T -Werte und die dazugehörige Standardabweichung für die verwendeten Primerkonzentrationen werden hier dargestellt - Forward- und Reverse Primer haben dieselbe Konzentration. Die Proben wurden jeweils im Dreifachansatz analysiert.

Zur Überprüfung der Amplikonlängen und der Spezifität der Primerpaare wurden mehrere Gelelektrophorese-Messungen durchgeführt. Dieser Schritt wurde durchgeführt, wenn die verwendeten Primerpaare bisher nicht beschrieben wurden.

In einer Publikation [98] wurde für das Gen *KCNQ1* ein Primerpaar beschrieben, welches allerdings noch nicht sequenziert wurde. Deshalb und um vor der Sequenzierung die Spezifität des Primerpaares und die Amplikonlängen des PCR-Produktes zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese-Messung durchgeführt. Dazu wurde ein 3,5 %-iges Agarosegel vorbereitet. Aufgetragen wurden jeweils die PCR-Produkte des Referenzgens *ACTB* und des Gens *KCNQ1* bei einer Konzentration von 50 nM und 100 nM wie in Abbildung 12 dargestellt. Zusätzlich wurden jeweils die Kontrollprobe und die Nullprobe auf das Gel aufgetragen.

In Abbildung 12 sind die Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte dargestellt. Das Referenzgen *ACTB* wurde ebenfalls aufgetragen, um einen Erfolg der RT-PCR und der Gelelektrophorese sicherzustellen. Bei der Bewertung der Fluoreszenzintensitäten der PCR-Produkte des Gens *KCNQ1* ist erkennbar, dass bei beiden Konzentrationen nur ein PCR-Produkt gebildet wurde.

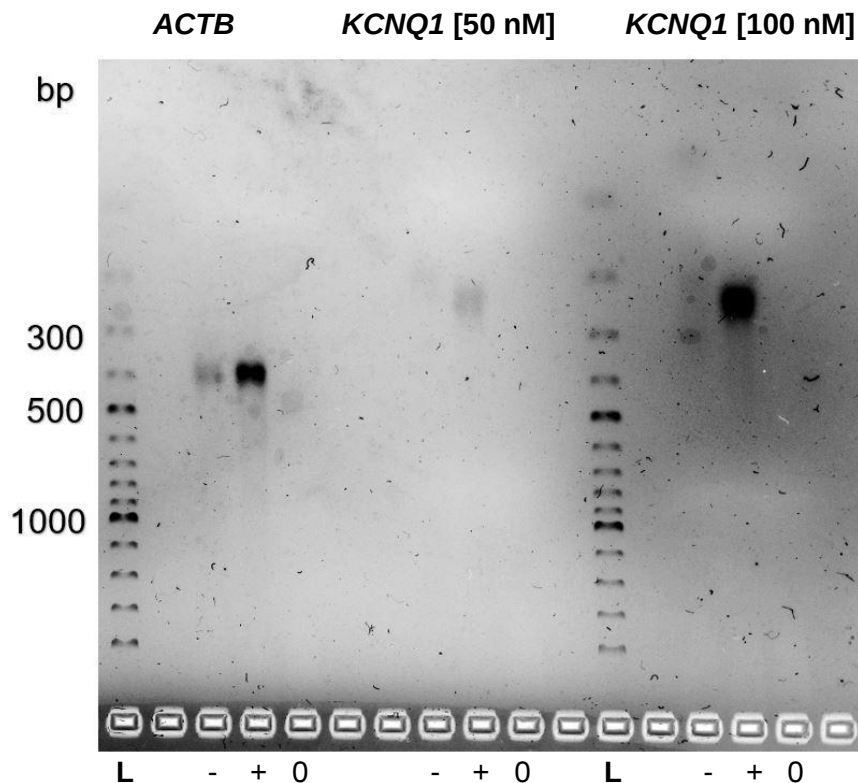


Abbildung 12: Gelelektrophorese der PCR Produkte von *ACTB* und *KCNQ1* bei 50 nM und 100 nM

Abgebildet sind PCR-Produkte, die bei unterschiedlichen Primerkonzentrationen amplifiziert wurden. Dabei sind links die PCR-Produkte des Referenzgens *ACTB* und in der Mitte und rechts die PCR-Produkte des Gens *KCNQ1* bei einer Konzentration von 50 nM und 100 nM augetragen. L = DNA/RNA-Leiter, Größenstandard [bp], - = cDNA-Synthese ohne reverser Transkriptase, + = cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase, 0 = Nullprobe, ohne cDNA.

Außerdem befinden sich die Amplikonlängen der PCR-Produkte im in Tabelle 1 angegebenen Größenbereich. Aufgrund der stärkeren Intensität der PCR-Produkte bei einer Konzentration von 100 nM wurde diese Konzentration für die Sequenzierung des Primerpaares und für weitere Messungen gewählt.

Die Etablierung der optimalen Primerkonzentration und die Überprüfung der Spezifität mittels Schmelzkurvenanalyse fand für jedes der 24 Primerpaare statt. Die ausgewählten Konzentrationen und die dabei gemessenen PCR-Effizienzen sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die angegebene PCR-Effizienz resultiert aus einer Dreifachbestimmung bei der angegebenen Konzentration. Weitere Informationen über die verwendeten Primerpaare sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primerkonzentrationen bei der RT-qPCR und mit der LinReg Software berechneten PCR-Effizienzen (n = 1-3)

Primer	Verwendete Konzentration [nM]	PCR-Effizienz
<i>Slc1a3</i>	100	1,90 ± 0,01 (n = 2)
<i>Entpd2</i>	100	1,83 (n = 1)
<i>T1R2</i>	50	1,87 ± 0,04 (n = 2)
<i>T1R3</i>	100	1,83 ± 0,01 (n = 3)
<i>GNAT3</i>	100	1,76 ± 0,01 (n = 2)
<i>Car4</i>	50	1,89 (n = 1)
<i>Snap-25</i>	500	1,90 (n = 1)
<i>Shh</i>	50	1,91 (n = 1)
<i>Hes6</i>	50	1,87 (n = 1)
<i>Sox2</i>	50	1,89 (n = 1)
<i>Ki67</i>	100	1,92 (n = 1)
<i>KCNQ1</i>	100	1,90 ± 0,00 (n = 2)
<i>Krt8</i>	100	1,76 (n = 1)
<i>Tas2r104</i>	100	1,77 (n = 1)
<i>Tas2r106</i>	100	1,83 (n = 1)
<i>Tas2r118</i>	100	1,83 (n = 1)
<i>Tas2r124</i>	100	1,82 (n = 1)
<i>Tas2r130</i>	100	1,83 (n = 1)
<i>PDE6b</i>	100	1,86 (n = 1)
<i>GLUT1</i>	100	1,89 (n = 1)
<i>5-HTR3b</i>	100	1,81 (n = 1)
<i>18S</i>	100	1,83 (n = 1)
<i>ACTB</i>	100	1,86 ± 0,02 (n = 3)
<i>HPRT</i>	100	1,90 (n = 1)

4.1.4 Diskussion der Methodenetablierung

Die Arbeitsschritte der Gewebeaufarbeitung, RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und RT-qPCR wurde zunächst validiert, um diese an den gegebenen Sachverhalt anzupassen. Durch die gezielte Veränderung verschiedenster Parameter konnte die RT-qPCR optimiert werden. In Abbildung 7 ist die Vorgangsweise der Methodenetablierung abgebildet.

Zunächst wurde die Gewebeaufarbeitung optimiert. Hier galt es die Papille so präzise wie möglich zu entfernen und im Anschluss die RNA zu stabilisieren. In vielen Studien wurde für die Extraktion der Papillen ein Enzymmix von Kollagenase und Dispase und anderen Enzymen verwendet [3, 6, 92, 93]. Bei der Methodenetablierung zeigte sich das Problem, dass nach erfolgreichem Entfernen der *Circumvallate* Papille, deren RNA-Isolierung und cDNA-Synthese, die RT-qPCR keinerlei Ergebnisse zeigte. Eine Gewebeaufarbeitung ohne Enzymmix zeigte bei der RT-qPCR Analyse eine erfolgreiche Amplifikation (siehe Abbildung 8). Eine Kontamination des Enzymmixes mit RNasen könnte eine mögliche Ursache für diese Ergebnisse sein. Möglicherweise trat dieses Problem auf, da hier mit gefrorenen Mäusezungen gearbeitet wurde, während in den oben genannten Studien frisch isoliertes Material verwendet wurde. Um die RNA zu stabilisieren, wurden die Proben in das Reagenz RNeasy-ICE eingelegt. Ausschlaggebend für die Verwendung von RNeasy-ICE waren die oftmalige Anwendung in der Praxis und die hohe RNA-Konzentration, die aus der Gewebeaufarbeitung mit dem Reagenz resultierte. Ein zusätzlicher Vorteil der Verwendung war, dass sich die Konsistenz des Gewebestückes nach dem Einlegen veränderte, wodurch die Papille aus dem umliegenden Gewebe leichter entfernt werden konnte.

Nach der Gewebeaufarbeitung wurden verschiedene Kits für die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und RT-qPCR verwendet (siehe 4.1.2). Der Vergleich der Kits des Herstellers NEB mit dem MasterPureTMRNA Purification Kit (Epicentre, USA) und dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Epicentre, USA) zeigte eine Zeitersparnis von ungefähr drei Stunden. Die mit dem NEB-Kit isolierte RNA zeigte verglichen mit der RNA, die nach Verwendung des Kits von Epicentre isoliert wurde, eine geringere Konzentration. Ein Vergleich der Amplifikationsgraphen (Abbildung 9) zeigte allerdings, dass die Proben, die mit den Kits des Herstellers NEB aufgearbeitet worden waren,

sowohl eine negative Nullprobe als auch eine negative Kontrollprobe aufwiesen. Die Kontamination mit genomischer DNA war bei den NEB Kits geringer oder inexistent. Zusätzlich zu dieser fehlenden oder minimalen Kontamination mit genomischer DNA wurden durch die Verwendung des Master Mix Luna® Universal niedrigere C_T -Werte als mit dem Master Mix SYBR™ Green erreicht. Aufgrund der RT-qPCR Ergebnisse wurde entschieden, die Kits des Herstellers NEB für sämtliche Schritte – RNA-Isolierung, cDNA-Synthese, RT-qPCR – zu verwenden.

Außerdem wurden die Annealingtemperatur und die Konzentration der Primerpaare optimiert. Dabei zeigten sich bei der Ermittlung der Annealingtemperatur unterschiedliche Optima, wie in Punkt 4.1.2 beschrieben. Abhängig vom untersuchten Gen zeigten sich sowohl bei einer Temperatur von 58,0°C als auch bei 60,2°C starke Fluoreszenzintensitäten. Letztendlich wurde eine Annealingtemperatur von 58,0°C gewählt, da hier bei allen getesteten Genen gute Ergebnisse erzielt wurden. Die Etablierung der optimalen Primerkonzentration fand für jedes der 24 Primerpaare statt. Dabei war es das Ziel, neben einer hohen Spezifität der Primer und niedrigen C_T -Werten, die Detektion mit genomischer DNA zu vermeiden. Als Voraussetzung galt eine negative Nullprobe.

Die Kombination aus den Kits von NEB und RNAlater-ICE wurde in keiner der Studien [3, 6, 92, 93] verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden repräsentative und reproduzierbare Ergebnisse erhalten.

4.2 Einfluss einer hochkalorischen Fütterung auf die Genexpressionslevel der *Circumvallate* Papille

In diesem Teil sind die Ergebnisse des Microarrays und der RT-qPCR Messungen angeführt.

Um nach der Methodenetablierung einen ersten Überblick über das Transkriptom der Maus zu erhalten, wurde von jeder der sechs Gruppen ein Microarray durchgeführt. Die Zuordnung der Mäuse in die jeweiligen Gruppen ist der Liste im Anhang zu entnehmen. Gene, die eine x-fache Änderung $\leq 0,5$ oder $\geq 1,5$ im Vergleich zur Kontrolle aufwiesen, wurden zusätzlich mit Hilfe der RT-qPCR analysiert. Außerdem wurden pro Geschmackszelltyp je zwei etablierte spezifische Marker ausgewählt (siehe 1.2 bis 1.6), die ebenfalls durch die Methode der RT-qPCR analysiert wurden.

Die mittleren x-fachen Änderungen der Marker wurden pro Geschmackszelltyp zusammengefasst. Bei jedem gemessenen Gen wurde ein Gruppenvergleich durchgeführt. Die Ergebnisse, die mittlere x-fache Änderung aus der RT-qPCR und die x-fache Änderung aus dem Microarray, wurden im Anschluss miteinander verglichen.

Eine Korrelationsanalyse wurde mit den gemessenen Expressionsleveln und denen an der Comenius Universität Bratislava bestimmten Markern (Körperzusammensetzung, -gewicht und Stoffwechselmarker) durchgeführt.

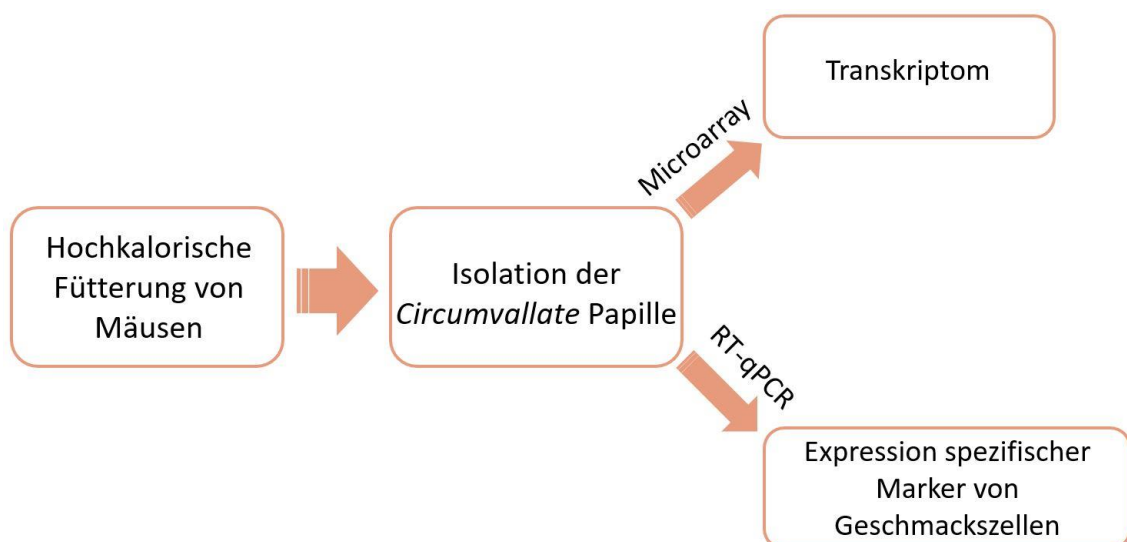


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte

4.2.1 Analyse des Transkriptoms mittels cDNA-Microarrays

Erste Erkenntnisse konnten auf Basis der durchgeführten Microarrays gewonnen werden. Dabei wurde pro Microarray die gepoolte RNA bzw. cDNA von allen Tieren der jeweiligen Gruppe eingesetzt.

Es zeigten sich Unterschiede, wenn die Behandlung mit der Gruppe CTRL + Wasser verglichen wurde. Diese werden auf der nächsten Seite dargestellt. Zunächst wurde das Augenmerk auf die Gabe von verschiedenen Cola-Sorten gelegt. Bei der Gegenüberstellung mit der Gruppe CTRL + Wasser zeigte die Gruppe CTRL + Cola AT eine Hinaufregulation (x-fache Änderung $\geq 1,5$) von 514 Genen und eine Herunterregulation (x-fache Änderung $\leq 0,5$) von 784 Genen. Die Gegenüberstellung der Gruppen CTRL + Wasser und CTRL + Cola SK zeigte eine x-fache Änderung $\geq 1,5$ bei 821 Genen und eine x-fache Änderung $\leq 0,5$ bei 1530 Genen. Die Hinauf- und Herunterregulation wurde durch die Gabe von McDonald's-Futter anstatt von Kontrollfutter verstärkt. Die Gruppe MCD + Wasser zeigt im Vergleich mit der Gruppe CTRL + Wasser eine Hinaufregulation bei 942 Genen und eine Herunterregulation bei 1643 Genen. Die Gruppen MCD + Cola AT oder MCD + SK zeigen im Vergleich mit der Gruppe CTRL + Wasser eine x-fache Änderung $\geq 1,5$ bei 4394 bzw. bei 2362 Genen und eine x-fache Änderung $\leq 0,5$ bei 1441 bzw. 1292 Genen.

In den unten dargestellten Abbildungen ist jeweils die Kontrollgruppe (CTRL + Wasser) mit einer behandelten Gruppe, CTRL + Cola AT oder Cola SK, verglichen worden. Bei diesen beiden Anwendungen zeigt sich eine Hoch- oder Herunterregulation von Genen. Die Ergebnisse der Gruppe CTRL + Cola AT, die in Abbildung 14 dargestellt sind, zeigen, dass Gene hauptsächlich hochreguliert werden. Im Gegensatz dazu ist bei der Gruppe CTRL + Cola SK weniger Effekt durch die Behandlung erkennbar. Der einzige Unterschied lag an dem verabreichten Getränk. Werden die Ergebnisse der Fütterungen CTRL + Cola AT oder CTRL + Cola SK verglichen, wird der Effekt von Cola bei Standardfutter erkennbar.

Die Gabe von McDonald's-Futter anstatt Kontrollfutter bewirkt eine Verstärkung der Hinauf- oder Herunterregulation. Beim Vergleich der Gruppe CTRL + Wasser und der Gruppe MCD + Wasser (Abbildung 14) wird erkennbar, dass hier Gene hauptsächlich herabreguliert werden. Die Fütterung führt dazu, dass eine Vielzahl von Genen, im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser, herunterreguliert wird.

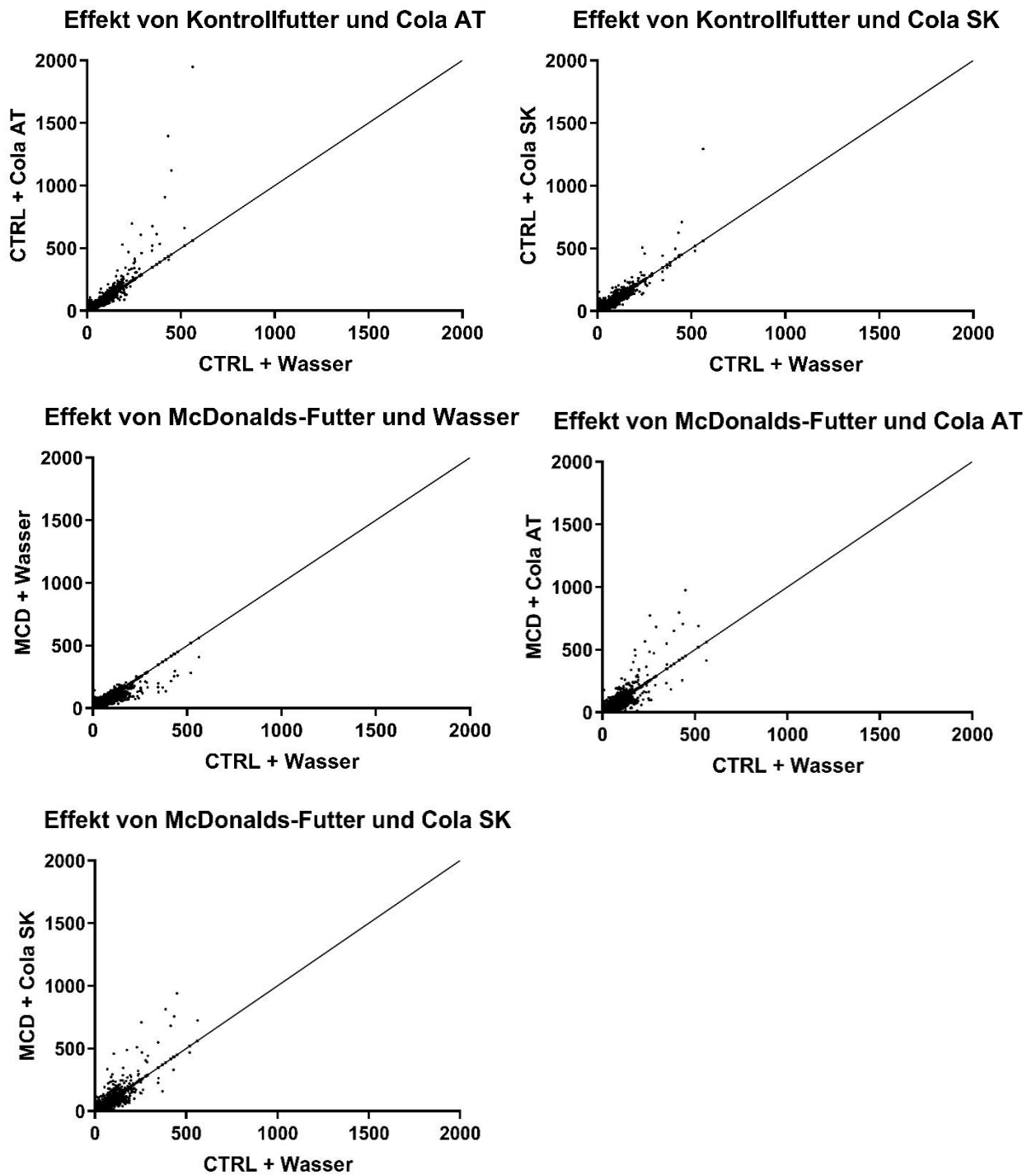


Abbildung 14: Effekt der unterschiedlichen Fütterungen im Vergleich zur Kontrollgruppe

Dargestellt sind die Effekte der fünf verschiedenen Fütterungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die gemessenen Werte wurden normalisiert und gegeneinander aufgetragen.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der Gruppen CTRL + Cola AT oder CTRL + Cola SK verglichen mit der Gruppe CTRL + Wasser zeigt, dass die Wahl des Getränks dazu führt, dass mehrere Gene hochreguliert werden. Dieser Effekt zeigt sich auch in den Gruppen, welche McDonald's-Futter erhielten (siehe Abbildung 14) und wird dadurch verstärkt. Durch die Variation des Getränkes, in diesem Fall Cola AT oder Cola SK anstatt von Wasser, werden manche Gene, im Vergleich zur Kontrollgruppe, stärker exprimiert.

Sowohl bei Standardfutter als auch bei McDonald's-Futter werden bei der Bewertung der Ergebnisse nur wenige Differenzen durch die Gabe von Cola AT oder Cola SK sichtbar.

Um nun einen spezifischeren Eindruck von der Thematik zu erhalten, wurde das Augenmerk auf Geschmacksrezeptoren und wichtige Moleküle in der Signalübertragung von Geschmackszellen gelegt. Dafür wurden zunächst Gene ausgewählt, die die Rezeptoren der fünf Geschmacksrichtungen kodieren (siehe 1.3 bis 1.5).

Dazu zählen:

- 35 Bitterrezeptoren der Maus [104],
- das Heterodimer für den Süßgeschmack (T1R2 + T1R3) [31],
- das Heterodimer für den Umamigeschmack (T1R1 + T1R2) [38, 39, 45] und
- der ENaC.

Außerdem wurden die Veränderungen der Untereinheiten des G-Proteins genauer untersucht. Der GPCR spielt bei dem Signaltransduktionsweg von bitter, süß und umami eine wichtige Rolle (siehe 1.4). Die Adenylatcyclase ist ein Enzym bei der Signaltransduktion über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Insgesamt gibt es zehn Isoformen dieses Enzyms, die von den Genen *Adcy1-10* kodiert werden. Phosphodiesterasen dienen zum Beenden eines einwirkenden Signals auf eine Sinneszelle [12]. Serotonin war der erste nachgewiesene Neurotransmitter [80]. Die Genexpressionslevel von Serotoninrezeptoren, Glucosetransportern (GLUT1, GLUT4), des SGLT1, Insulin, sowie Insulinrezeptoren wurden analysiert. Eine vollständige Auflistung aller ausgewählten 116 Gene befindet sich im Anhang. Es wurden die x-fachen Änderungen von 116 Genen, die im Microarray analysiert wurden, gruppenweise miteinander verglichen.

In Abbildung 15 sind die Änderungen der Genexpressionslevel der 35 Bitterrezeptoren in Form einer Heatmap dargestellt. Anhand des Farbspektrums lässt sich der Effekt der unterschiedlichen Fütterungen auf die Expression gut erkennen.

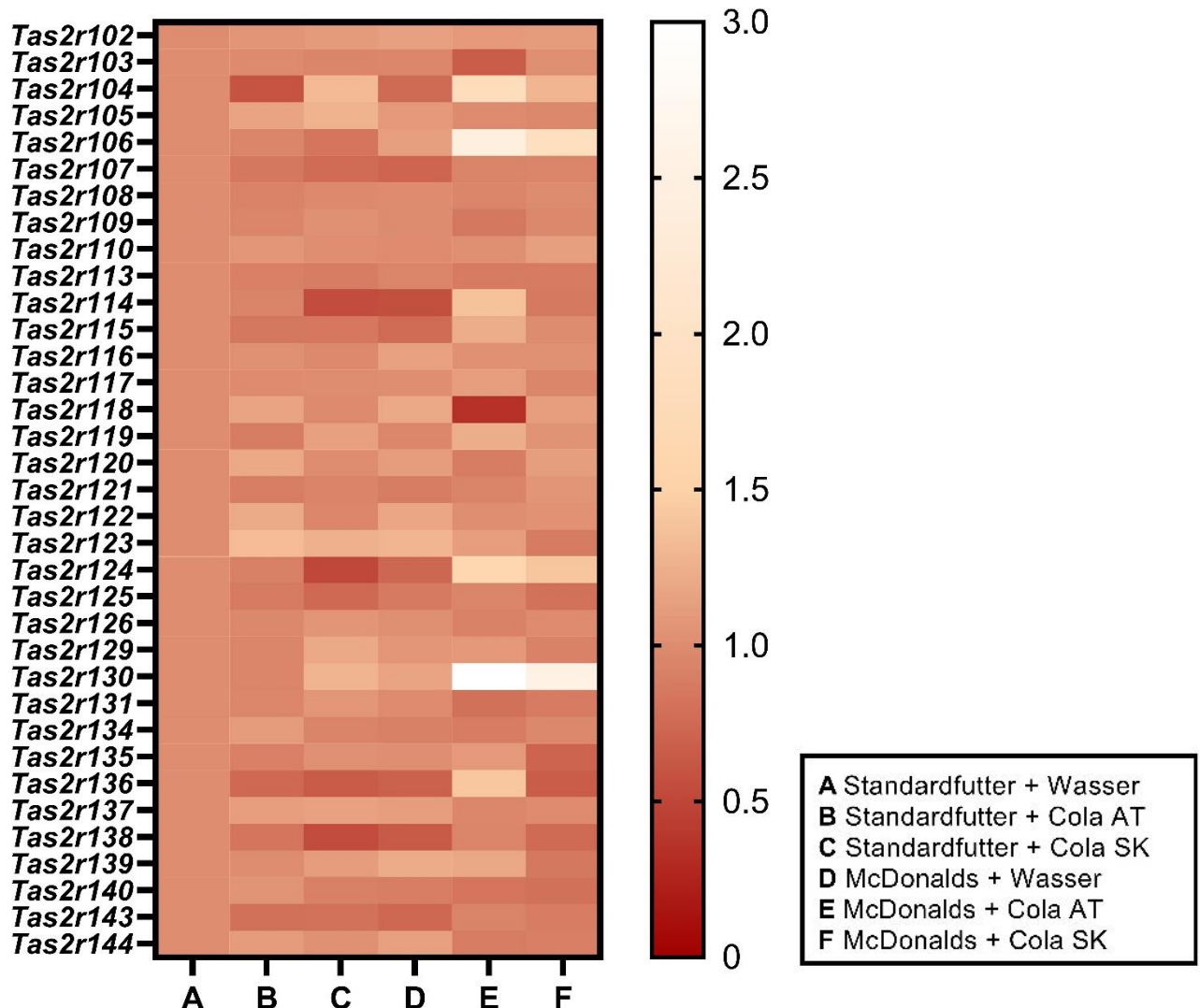


Abbildung 15: Die x-fache Änderung der 35 Bitterrezeptoren der Maus

In der Heatmap sind die sechs Gruppen (A-F) und die x-fachen Änderungen eines Gens für jede Gruppe (n=7-12), bezogen auf die Kontrollgruppe (A), aufgetragen. Die Genexpressionswerte wurden mit Hilfe von NimbleScan normalisiert, die x-fachen Änderungen wurden mit Excel berechnet.

Dabei stechen die Gene *Tas2r104*, *Tas2r106*, *Tas2r118*, *Tas2r124* und *Tas2r130* hervor. Die höchste Abweichung von einer x-fachen Änderung gleich 1 ist bei *Tas2r130* zu finden: Bei der Gruppe MCD + Cola AT liegt die x-fache Änderung bei 3,00 und bei MCD + Cola SK bei 2,55.

Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem Kontrollfutter und McDonald's-Futter erkennbar. Die restlichen Gruppen zeigen Werte zwischen 0,50 und 1,50.

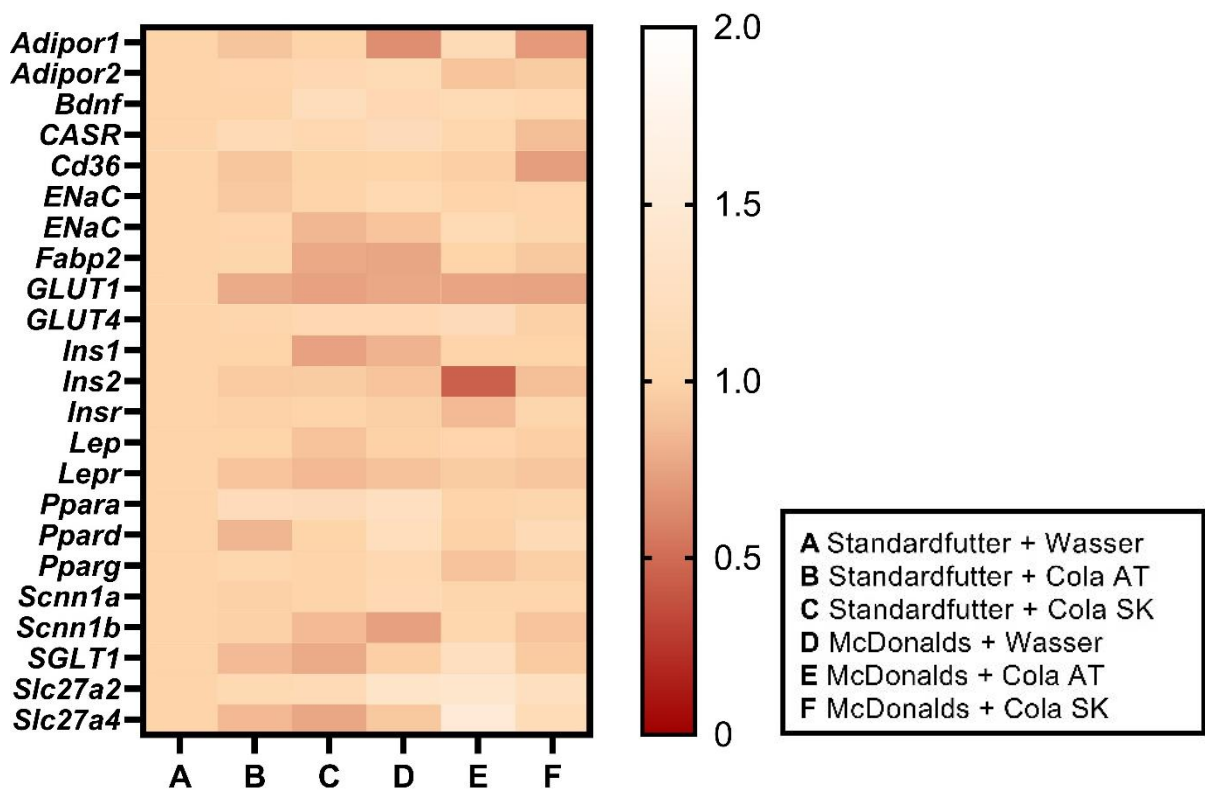


Abbildung 16: Die x-fache Änderung von im Stoffwechsel relevanten Genen

In der Heatmap sind die sechs Gruppen (A-F) und die x-fachen Änderungen eines Gens für jede Gruppe (n=7-12), bezogen auf die Kontrollgruppe (A), aufgetragen. Die Genexpressionswerte wurden mit Hilfe von NimbleScan normalisiert, die x-fachen Änderungen wurden mit Excel berechnet.

Neben Bitterrezeptoren werden auch zahlreiche Moleküle und Rezeptoren der Signaltransduktion und des Stoffwechsels angesprochen. In Abbildung 16 sind die x-fachen Änderungen von Molekülen und Genen, welche eine Rolle im Stoffwechsel spielen, dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten nur wenig Einflüsse durch die differentielle Fütterung auf die Expressionswerte bemerkt werden. Die Genexpressionswerte des Hormons Insulin zeigen in der Gruppe MCD + Cola AT eine x-fache Änderung von 0,44. Die x-fachen Änderungen des Glucosetransporters GLUT1 werden in jeder Gruppe herunterreguliert, es ergeben sich folgende Werte: CTRL + Cola AT 0,78, CTRL + Cola SK 0,74, MCD + Wasser 0,77, MCD + Cola AT 0,75 und MCD + Cola SK 0,74.

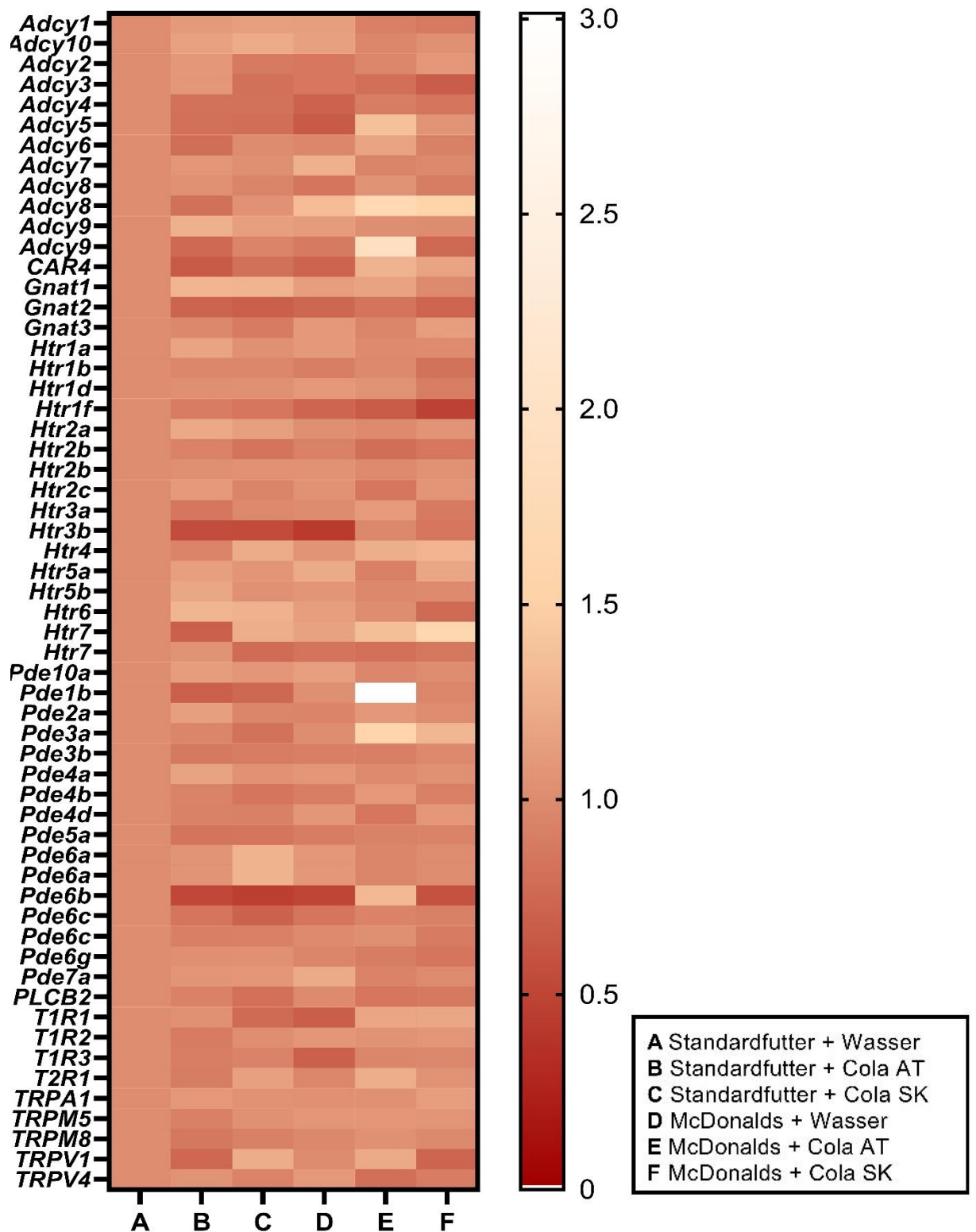


Abbildung 17: Die x-fachen Änderungen von in der Signaltransduktion relevanten Genen

In der Heatmap sind die sechs Gruppen (A-F) und die x-fachen Änderungen eines Gens für jede Gruppe (n=7-12), bezogen auf die Kontrollgruppe (A), aufgetragen. Die Genexpressionswerte wurden mit Hilfe von NimbleScan normalisiert, die x-fachen Änderungen wurden mit Excel berechnet.

Die x-fachen Änderungen der ausgewählten Gene, welche in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle spielen, sind in Abbildung 17 in Form einer Heatmap dargestellt. Phosphodiesterasen wandeln die Second Messenger cAMP und zyklisches Guanosinmonophosphat zu Adenosinmonophosphat und Guanosinmonophosphat um. Durch die Behandlungen zeigen mehrere Untereinheiten von Phosphodiesterasen hohe x-fache Änderungen (*Pde2a*, *Pde6b*). Die Genexpressionswerte der Serotoninrezeptoren werden vermehrt herunterreguliert: Bei den Gruppen CTRL + Cola AT (0,55) oder Cola SK (0,53) und MCD + Wasser (0,41) zeigen sich bei *5-HTR3b* sehr niedrige x-fache Änderungen, diese sind in den Klammern angegeben.

Die RT-qPCR liefert nachweislich sensitivere Ergebnisse als DNA-Microarray Techniken [96]. Um eine höhere Sensitivität der Genexpressionsdaten zu erhalten, wurden die Veränderungen mit Hilfe der RT-qPCR gemessen. Die Entscheidung, welche Gene mittels RT-qPCR genauer analysiert werden, wurden auf Basis der Microarray Daten getroffen. Dabei wurden diejenigen ausgewählt, bei denen der stärkste Effekt durch eine Behandlung erzielt wurde. Dazu zählen: *Tas2r104*, *Tas2r106*, *Tas2r118*, *Tas2r124*, *Tas2r130*, *PDE*, *5-HTR3b* und *Slc2a1*.

Zusätzlich wurden pro Geschmackszelltyp zwei Marker gewählt, die den jeweiligen Zelltyp in der Messung repräsentieren sollen. Neben Markern für die Zelltypen I-III, Basal- und Stammzellen die bereits in den Kapiteln 1.3-1.6 erläutert wurden, wurden Marker analysiert, welche für alle diese Geschmackszellen gelten. Dazu zählen der Kaliumkanal $K_v7.1$, dieser wird vom Gen *KCNQ1* codiert [105], und Keratin 8 (*Krt8*) [106]. Die Auswahl der Marker wurde auf Basis von Literaturrecherche getroffen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Übersicht der Marker für Geschmackszelltypen

Geschmackszelltyp	Untersuchter Marker	Quelle
Typ I	<i>Slc1a3</i> , <i>Entpd2</i>	[19, 25]
Typ II	<i>GNAT3</i> , <i>T1R3</i>	[29–31]
Typ III	<i>Snap-25</i> , <i>Car4</i>	[64, 65]
Basalzellen	<i>Shh</i> , <i>Hes6</i>	[67–69]
Stammzellen	<i>Ki67</i> , <i>Sox2</i>	[70, 71]
Alle Typen	<i>KCNQ1</i> , <i>Krt8</i>	[105, 106]

4.2.2 Genexpression ausgewählter Marker in der Circumvallate Papille

In der *Circumvallate* Papille der Maus herrscht eine hohe Dichte an Geschmackszellen ($2,1 \text{ Zellen}/\mu\text{m}^3$) [107]. Aufgrund dieser Tatsache wurde die *Circumvallate* Papille für die Analysen gewählt. Im Vergleich zu den cDNA-Microarrays wurden die Genexpressionswerte, welche mit Hilfe der RT-qPCR ermittelt wurden zunächst pro Tier gemessen und im Anschluss gruppenweise zusammengefasst. Die Analyse der Marker sollte zeigen, ob sich durch die Gabe verschiedener Cola-Sorten die Genexpression der Geschmackszelltypenmarker verändert, beziehungsweise ob sich durch die Gabe von McDonald's-Futter anstatt von Kontrollfutter dieser Effekt verstärkt.

In Abbildung 18 sind die x-fachen Änderungen der Marker von Geschmackszelltypen und die Unterschiede dieser zwischen den Fütterungsgruppen ($n = 6-11$) dargestellt. Bei keinem Zelltyp wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen aufgezeigt. Bei den Markern der Geschmackszelltypen I-III zeigen weder die Marker noch das geometrische Mittel der zwei Marker pro Typ einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen.

Die einfaktorielle ANOVA zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der x-fachen Änderungen bei Basalzellen ($p = 0,184$; $\alpha = 0,05$; $n = 6-11$). Bei der Analyse der Genexpressionsdaten der Basalzellen fällt vor allem in der Gruppe MCD + Cola AT eine Ansammlung der Daten bei einer x-fachen Änderung kleiner eins auf. Diese resultiert aus den Daten des Markers *Shh*. Bei alleiniger Bewertung der Genexpressionsdaten des Markers *Shh* ergab die einfaktorielle ANOVA ein signifikantes Ergebnis ($p = 0,023$; $\alpha = 0,05$). Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Gruppen MCD + Cola AT ($n = 6$) und MCD + Cola SK ($n = 7$) gefunden ($p = 0,010$; $\alpha = 0,05$). Die gemessene mittlere x-fache Änderung zeigt in der Gruppe MCD + Cola AT einen Wert von $0,35 \pm 0,06$ – eine deutliche Herunterregulation durch die Fütterung. In der Gruppe MCD + Cola SK beträgt die mittlere x-fache Änderung $1,55 \pm 1,00$.

Wie auch bei allen anderen Zelltypen sind bei den Genexpressionsdaten der Stammzellen keine statistisch signifikanten Unterschiede erkennbar. Der Stammzellenmarker Ki-67 zeigt einen Trend zur Signifikanz zwischen den Gruppen CTRL + Cola AT und MCD + Cola SK ($p = 0,053$; $\alpha = 0,05$). Dabei weist die Gruppe CTRL + Cola AT ($n = 7$) eine x-fache Änderung von $1,71 \pm 1,30$ auf und die Gruppe MCD + Cola SK ($n = 6$) eine x-fache Änderung von $0,61 \pm 0,21$.

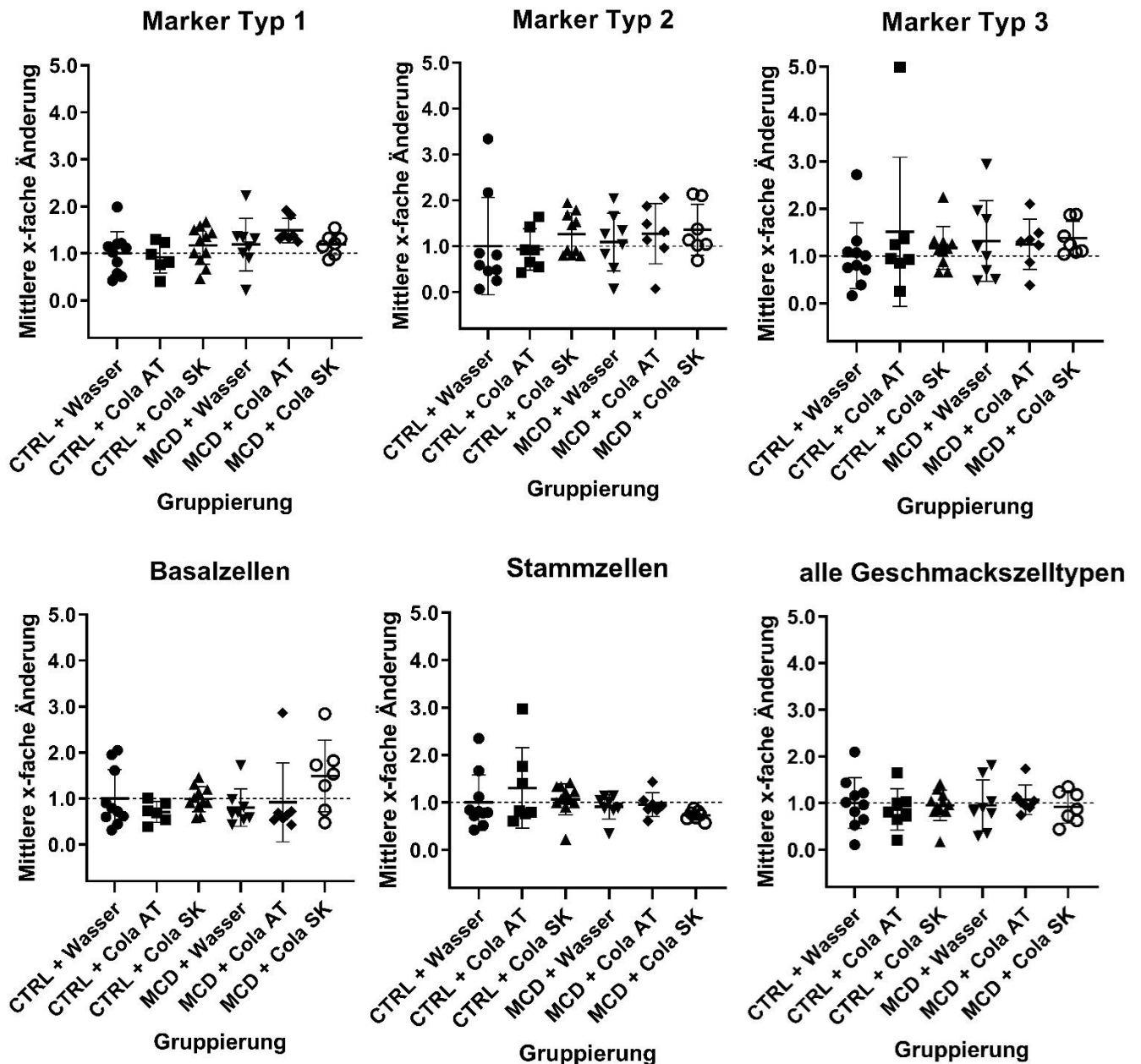


Abbildung 18: Darstellung der mittleren x-fachen Änderung, bezogen auf die sechs Gruppen, der verschiedenen Zelltypen

Für jeden der Marker für einen Zelltyp wurde zunächst die mittlere x-fache Änderung auf Ausreißer geprüft (ROUT Q = 1 %). Von den bereinigten Daten wurde das geometrische Mittel berechnet. Mit diesen Daten wurde eine One-way Anova ($\alpha = 0,05$) durchgeführt. Signifikanzen werden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$) dargestellt. Keine Markierung bedeutet, dass die Ergebnisse nicht signifikant ($p > 0,05$) sind.

CTRL + Wasser n = 9-10, CTRL + Cola AT n = 6-7, CTRL + Cola SK n = 10-11, MCD + Wasser n = 8, MCD + Cola AT n = 7, MCD + Cola SK n = 7

4.2.3 Wirkung auf fünf Bitterrezeptoren, 5-HTR3b, PDE6b und Slc2a1 ermittelt durch die RT-qPCR

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der RT-qPCR der in Punkt 4.2.1 ausgewählten Gene analysiert. Die Expression der acht Gene *5-HTR3b*, *PDE6b*, *Slc2a1*, *Tas2r104*, *Tas2r106*, *Tas2r118*, *Tas2r124* und *Tas2r130* wurde in der *Circumvallate* Papille gemessen.

Bitterrezeptoren sind G-Protein gekoppelt und sind bei Geschmackszellen des Typ II zu finden [108]. Die Anzahl an *Tas2r* Genen variiert von Spezies zu Spezies. Bei der Maus werden 35 Gene gezählt [104].

Um genauere Einblicke zu erhalten, sind in Abbildung 19 die durch die RT-qPCR ermittelten mittleren x-fachen Änderungen jener Bitterrezeptoren dargestellt, die aufgrund der cDNA-Microarray Ergebnisse ausgewählt wurden.

Die durchgeführte einfaktorielle ANOVA zeigten bei den Genen *Tas2r106*, *Tas2r118* und *Tas2r124* jeweils keinen statistisch signifikanten Unterschied. Signifikante Unterschiede zeigen sich bei dem Gen *Tas2r130*: Die Ergebnisse der einfaktoriellen ANOVA zeigen, dass die Gruppe MCD + Cola SK (n = 7) einen signifikanten Unterschied zur MCD + Wasser (n = 7) ($p = 0,042$; $\alpha = 0,05$) und zur Gruppe MCD + Cola AT (n = 6) ($p = 0,006$; $\alpha = 0,05$) aufweist. Die x-fachen Änderungen der Gruppen betragen: $0,67 \pm 0,42$ (MCD + Wasser), $0,29 \pm 0,09$ (MCD + Cola AT) und $1,98 \pm 1,52$ (MCD + Cola SK). Ein weiterer signifikanter Unterschied ließ sich beim Gen *Tas2r104* zwischen den Gruppen CTRL + Cola SK (n = 11) und MCD + Cola AT (n = 6) feststellen ($p = 0,039$; $\alpha = 0,05$). Dabei beträgt die mittlere x-fache Änderung der Gruppe CTRL + Cola SK $1,65 \pm 1,06$ im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser (n = 9) und die der Gruppe MCD + Cola AT $0,39 \pm 0,18$ im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser.

Die mittleren x-fachen Änderungen des Gens *Tas2r124* zeigen einen tendenziellen Unterschied zwischen den Gruppen MCD + Cola AT (n = 6) und MCD + Cola SK (n = 7) ($p = 0,054$; $\alpha = 0,05$). Die mittleren x-fache Änderungen der Gruppen betragen im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser (n = 9) $0,34 \pm 0,15$ (MCD + Cola AT) und $1,84 \pm 1,68$ (MCD + Cola SK).

Bei der Beurteilung der Genexpressionsdaten der fünf Bitterrezeptoren fällt die hohe Standardabweichung in der Gruppe MCD + Cola SK auf.

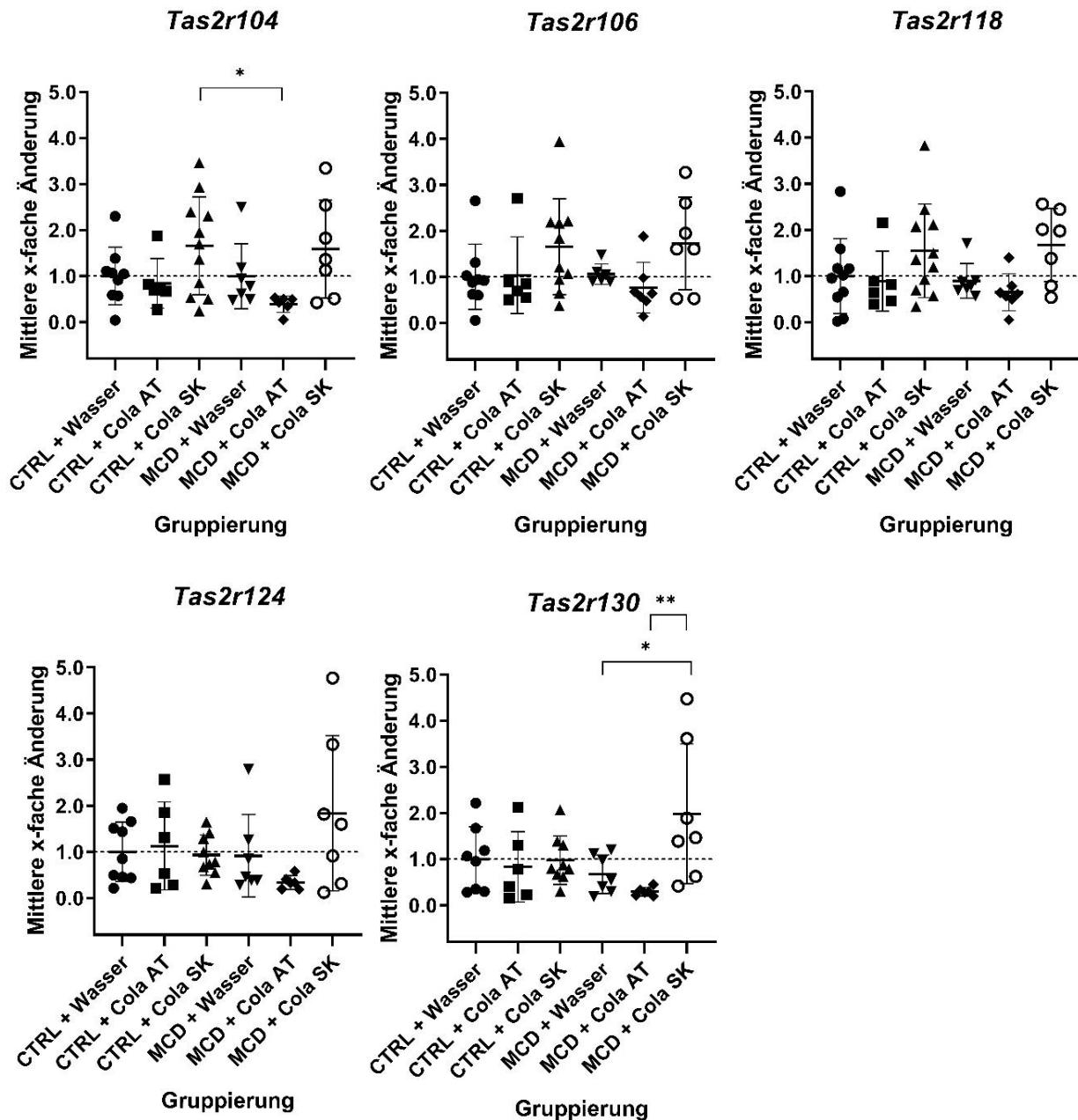
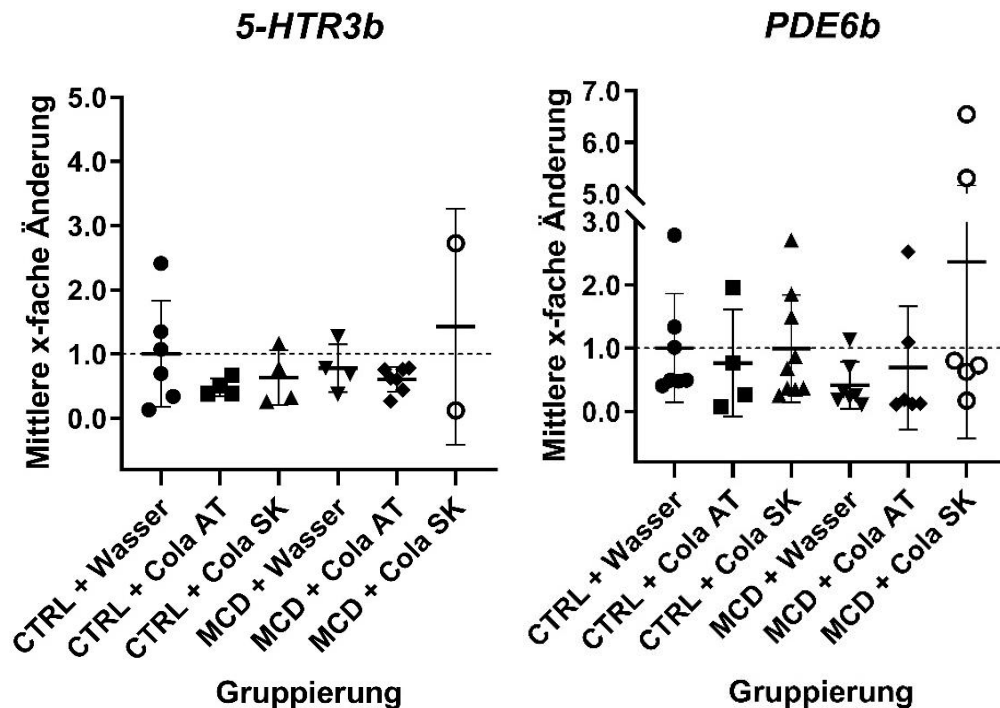


Abbildung 19: Effekt der Fütterung auf die mittlere x-fache Änderung der Bitterrezeptoren

Die mittlere x-fache Änderung wurde auf Ausreißer geprüft (ROUT Q = 1 %). Mit diesen Daten wurde eine One-way Anova ($\alpha = 0,05$) durchgeführt. Signifikanzen werden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Keine Markierung bedeutet, dass die Ergebnisse nicht signifikant ($p > 0,05$) sind.

CTRL + Wasser n = 8-10, CTRL + Cola AT n = 6, CTRL + Cola SK n = 9-11, MCD + Wasser n = 6-7, MCD + Cola AT n = 6-7, MCD + Cola SK n = 7



Abbildungung 20: Effekt der differentiellen Fütterung auf die mittlere x-fache Änderung von 5-HTR3b und PDE6b

Die mittlere x-fache Änderung wurde auf Ausreißer geprüft (ROUT Q = 1 %). Mit diesen Daten wurde eine One-way Anova ($\alpha = 0,05$) durchgeführt. Signifikanzen werden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Keine Markierung bedeutet, dass die Ergebnisse nicht signifikant ($p > 0,05$) sind.

CTRL + Wasser $n = 6$ (5-HTR3b) bzw. 7 (PDE6b), CTRL + Cola AT $n = 4$, CTRL + Cola SK $n = 4$ (5-HTR3b) bzw. 9 (PDE6b), MCD + Wasser $n = 4$ (5-HTR3b) bzw. 7 (PDE6b), MCD + Cola AT $n = 7$ (5-HTR3b) bzw. 6 (PDE6b), MCD + Cola SK $n = 2$ (5-HTR3b) bzw. 6 (PDE6b)

In Abbildung 20 sind die Effekte der Fütterungen auf die Genexpression von 5-HTR3b und PDE6b im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser graphisch dargestellt. Eine einfaktorielle ANOVA stellte bei beiden Genen keinen signifikanten Unterschied fest. In der Gruppe MCD + Cola SK ($n = 2$) des Gens 5-HTR3b ist die höchste Standardabweichung der x-fachen Änderung zu finden. Hier ist zu beachten, dass diese Gruppe nur aus zwei Datenpunkten besteht. Weitere Mäuse in dieser Gruppe zeigten Genexpressionwerte unterhalb der Erfassungsgrenze.

In Abbildung 21 sind die mittleren x-fachen Änderungen des Gens *Slc2a1* der verschiedenen Fütterungsgruppen im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser (n = 10) dargestellt. Bei diesem Gen zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Genexpressionswerten der verschiedenen Cola-Sorten. Allerdings sind signifikante Unterschiede der Genexpressionwerte erkennbar, wenn die Mäuse anstatt Kontrollfutter McDonald's-Futter erhalten hatten. Das Gen *Slc2a1* kodiert für den Glucosetransporter GLUT1. Die einfaktorielle ANOVA zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied bei dem Gen *Slc2a1* ($p = 0,013$; $\alpha = 0,05$). Bei genauerer Analyse der Genexpressionsdaten zeigen sich zwei statistisch signifikante Unterschiede bei dem Gen *Slc2a1*: Zwischen der Gruppe CTRL + Cola AT (n = 7) und der Gruppe MCD + Wasser (n = 8) ($p = 0,010$; $\alpha = 0,05$) und zwischen CTRL + Cola AT (n = 7) und der Gruppe MCD + Cola AT (n = 7) ($p = 0,023$; $\alpha = 0,05$).

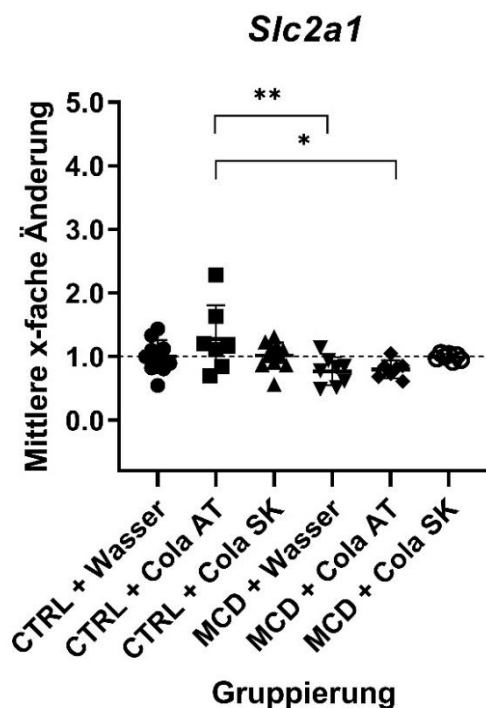


Abbildung 21: Effekt der differentiellen Fütterung auf die mittlere x-fache Änderung von *Slc2a1*

Die mittlere x-fache Änderung wurde auf Ausreißer geprüft (ROUT Q = 1%). Mit diesen Daten wurde eine One-way Anova ($\alpha = 0,05$) durchgeführt. Signifikanzen werden mit * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$), *** ($p \leq 0,001$), **** ($p \leq 0,0001$). Keine Markierung bedeutet, dass die Ergebnisse nicht signifikant ($p > 0,05$) sind.

CTRL + Wasser n = 10, CTRL + Cola AT n = 7, CTRL + Cola SK n = 11, MCD + Wasser n = 8, MCD + Cola AT n = 7, MCD + Cola SK n = 7

4.2.4 Vergleich der Ergebnisse des DNA-Microarrays mit der RT-qPCR

In der untenstehenden Abbildung 22 werden die Daten des Microarrays mit den Daten der RT-qPCR miteinander verglichen. Bei den Microarray Analysen wurden pro Gruppe die einzelnen RNA-Proben gepoolt eingesetzt. Die erhaltenen Daten der RT-qPCR wurden pro Tier gemessen und im Anschluss gruppenweise zusammengefasst. Dadurch wurden sowohl bei den Microarray Analysen als auch bei den RT-qPCR Analysen die x-fachen Änderungen pro Gruppe erhalten.

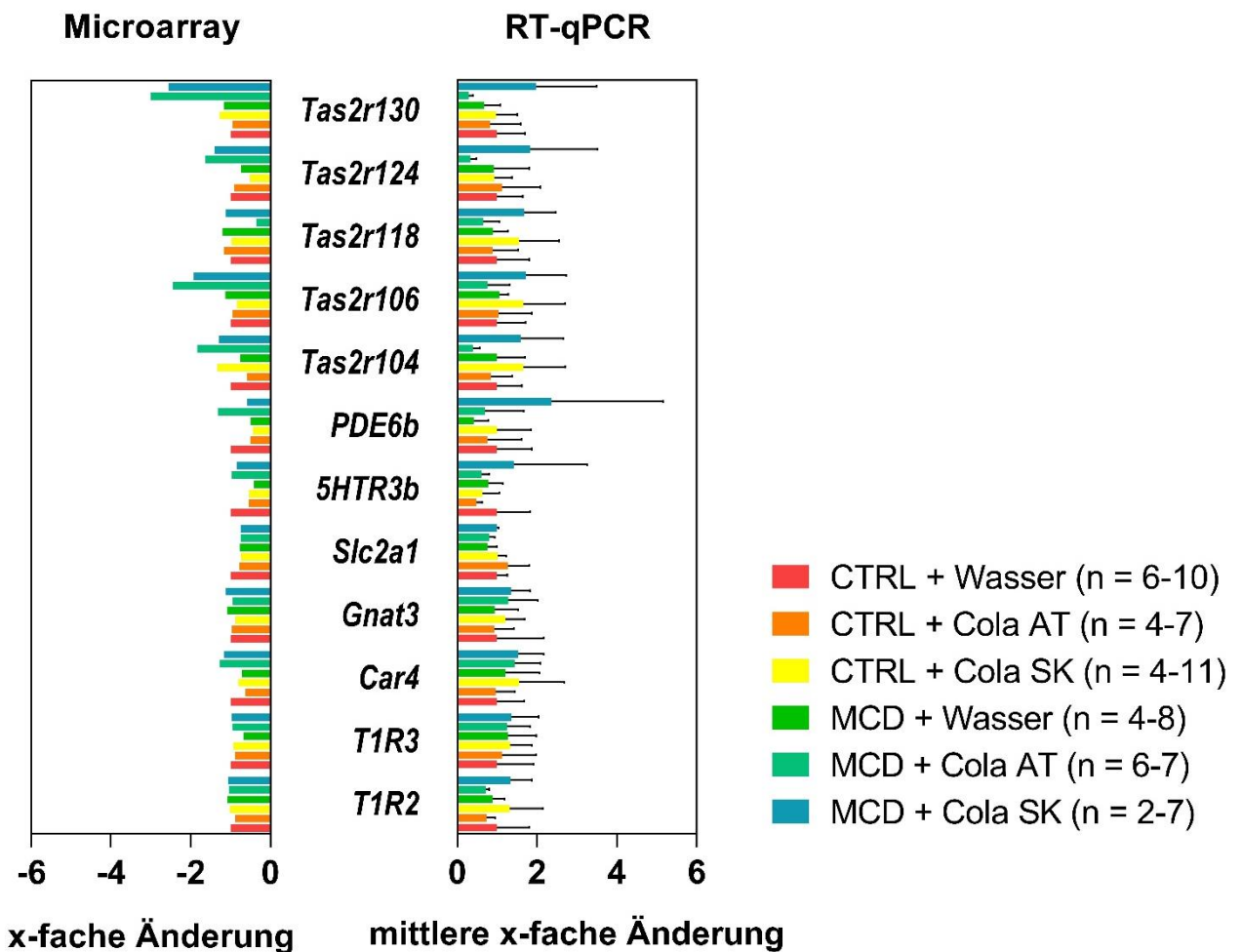


Abbildung 22: Vergleich der x-fachen Änderung (DNA-Microarray) und der mittleren x-fachen Änderung (RT-qPCR) ausgewählter Gene

Die normalisierten Expressionswerte des Microarrays werden in der linken Abbildung als x-fache Änderung angegeben. Die mittleren x-fache Änderungen der RT-qPCR Daten (rechts) wurden auf Ausreißer (ROUT Q = 1 %) überprüft. Die bereinigten Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Eine Two-way Anova wurde durchgeführt ($\alpha = 0,05$), es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied gefunden.

Zusätzlich zu den explizit ausgewählten Genen von Punkt 4.2.1 wurden jene Geschmackszelltyp-Marker, deren Expressionsniveaus ebenfalls im Microarray analysiert wurden, verglichen. *T1R2* wurde in der Methodenetablierung unter Punkt 4.1 öfters gemessen und aufgrund dessen ebenfalls in den Vergleich miteinbezogen. Mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 8.2.1 wurde eine zweifaktorielle ANOVA ($\alpha = 0,05$) durchgeführt.

Dabei wurden sowohl die einzelnen Gene als auch die unterschiedlichen Gruppen berücksichtigt. Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den Methoden DNA-Microarray und RT-qPCR gefunden. In der Grafik sind, bei manchen gemessenen Genen, nur wenige Unterschiede erkennbar.

Allerdings ist zu erwähnen, dass manche Datensätze, trotz Ausreißertest ($Q = 1 \%$), eine hohe Standardabweichung aufweisen (z.B. *PDE6b*).

4.2.5 Korrelation der Expressionsdaten mit Markern der Körperzusammensetzung, des Körpergewichtes und des Stoffwechsels

Im Zuge der Fütterungsstudie wurden an der medizinischen Universität Bratislava zahlreiche Marker der Körperzusammensetzung, des Körpergewichtes und des Stoffwechsels erhoben. Mit diesen Daten und den erhobenen Genexpressionsdaten der RT-qPCR Analysen wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet. In der unten abgebildeten Abbildung 23 ist die dazugehörige Korrelationsmatrix dargestellt. In der Grafik sind jene Gene dargestellt, welche einen signifikanten ($p \leq 0,05$) oder tendenziellen ($p < 0,1$) Unterschied zwischen den Gruppen aufweisen.

Es sind sowohl positive als auch negative Zusammenhänge zu erkennen. Zwischen den Markern sind einige starke Korrelationen sichtbar, wohingegen sich in Kombination mit den Expressionswerten nur wenig Zusammenhang erkennen lässt.

Bei den Geschmackszelltypen zeigt sich ein positiver Zusammenhang zwischen den Markern für alle Geschmackszellen und Typ III-Zellen und dem Gehalt an LDL-Cholesterin [mmol/L]. Dabei ergeben sich Korrelationskoeffizienten von 0,49 bzw. 0,41.

Phosphat wird zum Großteil über die Nahrung aufgenommen. In diesem Fall weisen Colagetränke einen Phosphatgehalt von 6 mg/100 ml auf [109]. In der Korrelationsanalyse ist eine starke positive Korrelation zwischen dem Phosphatgehalt im Plasma [mmol/L] und der Expression des Serotoninrezeptors erkennbar. Es zeigt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,80.

Ein schwach negativer Zusammenhang ist bei der Expression von GLUT1 in Kombination mit Parametern der Körperzusammensetzung zu erkennen.

Außerdem zeigen sich zwischen den gemessenen Bitterrezeptoren untereinander hohe Korrelationskoeffizienten. Dieser Zusammenhang ist ebenfalls in Kombination mit *5-HTR3b*, *PDE6b*, *T1R2* erkennbar.

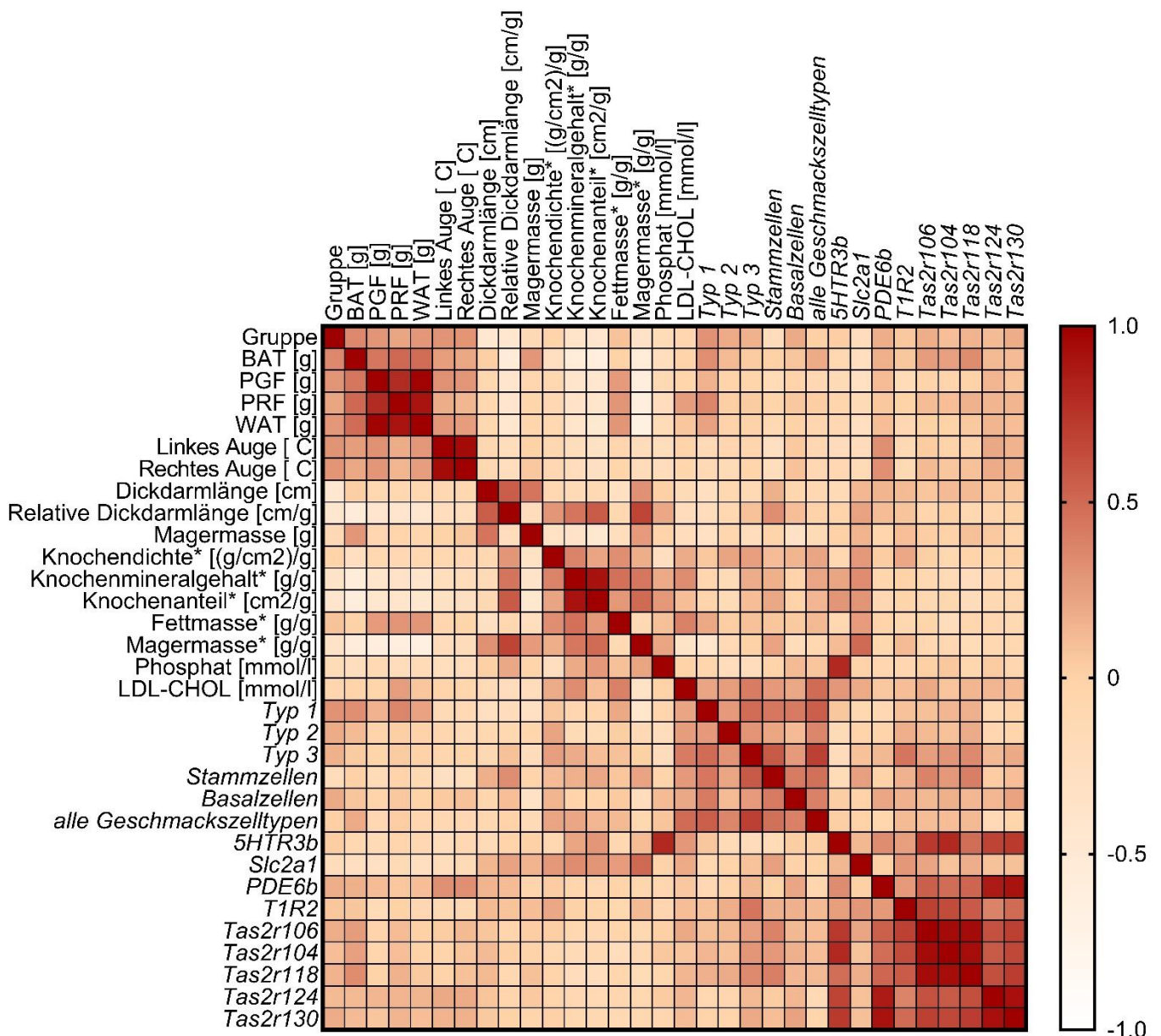


Abbildung 23: Zusammenhang von Markern der Körperzusammensetzung, des Körpergewichts und des Stoffwechsels und den bestimmten Expressionwerten, dargestellt anhand einer Korrelationsmatrix

Die mittlere x-fache Änderung der Expressionsdaten wurden auf Ausreißer geprüft (ROUT Q = 1%). Von den gereinigten Daten wurde von den Markern der Geschmackszelltypen, jeweils zwei, das geometrische Mittel berechnet. Die Merkmale wurden mit der Pearson Korrelationsanalyse miteinander kombiniert und die Korrelationskoeffizienten wurden berechnet. Dabei zeigt ein Wert von +1,0 einen positiven und ein Koeffizient von -1,0 einen negativen linearen Zusammenhang. Die mit * markierten Variablen sind relativ zum Körpergewicht [g] angegeben.

5. Diskussion

In den folgenden Seiten werden die Ergebnisse mit der Literatur verglichen und kritisch hinterfragt, um im Anschluss ein Fazit zu formulieren.

Die Diskussion der Methodenetablierung wurde bereits unter dem Punkt 4.1.4 abgehandelt.

Grundsätzlich muss differenziert werden, dass in vielen Studien das Hauptaugenmerk auf der Gabe von Zuckerlösungen liegt [6, 92, 93]. Dabei werden differente Süßungsmittel verwendet. Der Süßgeschmack wird allerdings immer vom Heterodimer *T1R2* und *T1R3* wahrgenommen [110].

Zunächst sollte in der Arbeit die Frage geklärt werden, ob sich durch die Gabe von Cola-Sorten mit differentieller Zusammensetzung signifikant unterschiedliche Daten der Genexpression zeigen. Wird die Gruppe CTRL + Wasser mit den Gruppen, die Standardfutter und Cola erhielten, kann auf den Effekt der zuckerhaltigen Getränke geschlossen werden.

In der Literatur wurden bisher vor allem die Effekte an Typ II Zellen untersucht [6, 92], dabei wurden oftmals die Gene *T1R2*, *T1R3* und *GNAT3* näher analysiert. In den folgenden angeführten Studien werden jene mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen. Zusätzlich werden die Differenzen zwischen den angewandten Methoden diskutiert. Additive Informationen zu den Studien sind im Kapitel Ernährung und Geschmack unter Punkt 1.8 zu finden.

In der Studie von Choo und Dando [6] wurden die Genexpressionsdaten von verschiedenen Genen, unter anderem *T1R2*, *T1R3* und *GNAT3*, in der *Circumvallate* Papille bestimmt. Weiblichen Mäusen wurde täglich entweder Wasser, Saccharose-Lösung oder Sucralose-Lösung verabreicht. Zusätzliche Informationen bezüglich der Dosierungen der Lösungen sind unter Punkt 1.8 angegeben. Die Gabe der Lösungen erfolgte über einen Zeitraum von vier Wochen vor der Schwangerschaft bis zwei Wochen nach der Schwangerschaft, insgesamt ca. 9 Wochen. Untersucht wurde die Genexpression der männlichen Nachkommen, die direkt keine der Behandlungen erhalten hatten. Die Ergebnisse zeigten keine statistisch signifikanten Differenzen der Genexpression bei den untersuchten Genen, allerdings konnten signifikante Veränderungen im Verhalten der Saccharose- und Sucralose-Gruppen festgestellt

werden. Die Isolierung der *Circumvallata* Papille erfolgte mit Hilfe eines Enzymmix von Dispase II und Collagenase I. Ein Enzymmix wurde in dieser Arbeit nicht verwendet, da die Ergebnisse der durchgeführten Methodenetablierung (siehe 4.1) keine Verwendung dessen implementierten. Für die Beurteilung der Genexpression mittels RT-qPCR wurden für die Gene *T1R2*, *T1R3* und *GNAT3* dieselben Primerpaare wie in dieser Arbeit verwendet. Ein großer Unterschied zu dieser Studie ist, dass hier die Genexpression der Nachkommen untersucht wurde, diese erhielten im Gegensatz zu der hier durchgeführten Fütterungsstudie selbst keine der Behandlungen.

In der Studie von Zhao et al. [92] wurde unter anderem den Einfluss einer Saccharinsupplementierung auf die mRNA Expression des Süßrezeptors untersucht. Dabei wurden männliche und weibliche Ratten entweder mit einer Saccharin-Lösung [$c = 0,005 \text{ M/L}$] ($n = 12$) oder Wasser ($n = 12$) für 10 Wochen gefüttert. Hier bestand ein freier Zugang zu Futter und Trinklösung, es gab jedoch keine fixe tägliche Dosis. In der *Circumvallata* Papille wurden die Genexpressionswerte des Heterodimers *T1R2* und *T1R3* analysiert. Bei der Analyse der *T1R3* mRNA Expression wurde, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, in der männlichen Gruppe ein signifikanter Unterschied festgestellt. Bei dieser Studie und der Fütterungsstudie dieser Arbeit wurden unterschiedliche Versuchstiere verwendet. Im Vergleich zur Studie von Choo und Dando [6] sind hier keine Sequenzen der verwendeten Primerpaare angegeben. Im Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit den Resultaten dieser Studie, wird sichtbar, dass die verwendeten Parameter ähnlich zueinander sind. In der hier vorliegenden Arbeit hatten die Versuchstiere freien Zugang zu Futter und Trinken, wobei Standardfutter als Nahrung diente und die Fütterungszeit in der durchgeführten Studie mehr als doppelt so lang war.

In vorliegender Arbeit zeigte die Aufnahme von unterschiedlicher Zuckerlösungen bei den Geschmackszellen Typ I-III und den Stammzellen nur minimale Unterschiede (Punkt 4.2.2). Die einfaktorielle ANOVA der geometrischen Mittel der jeweiligen Marker von Geschmackszelltypen zeigten im Gruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied. Zusätzlich wurde mit Hilfe der RT-qPCR die Genexpression von *T1R2* bestimmt. Das Heterodimer *T1R2* und *T1R3* kodiert für den G-Protein-gekoppelten Süßrezeptor [37]. Die durchgeführte einfaktorielle ANOVA zeigte bei dem Gen *T1R2* im Gruppenvergleich keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,234$; $\alpha = 0,05$). Bei Beurteilung der

Genexpressionsdaten werden erhöhte Expressionswerte aufgezeigt, wenn als Süßungsmittel Glucose-Fructose-Sirup verwendet wird (Abbildung 22).

Die Verabreichung von mit Saccharose gesüßter Cola und die mit Glucose-Fructose-Sirup gesüßte Cola zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Ergebnisse. Bei Analyse der Genexpressionsdaten des Gens *Shh*, ein Marker der Basalzellen, zeigte sich im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser zwischen den Gruppen MCD + Cola AT und MCD + Cola SK ein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,010$; $\alpha = 0,05$). Die x-fache Änderung der Gruppe MCD + Cola AT beträgt $0,35 \pm 0,06$ und die der Gruppe MCD + Cola SK beträgt $1,55 \pm 1,00$.

Die geometrischen Mittel der Genexpressionswerte von verschiedenen Zelltypen zeigen im Vergleich mit der Gruppe CTRL + Wasser keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen CTRL + Cola AT und CTRL + Cola SK. Ein Effekt zwischen den unterschiedlichen Cola-Sorten zeigt sich erst bei der Gabe von McDonald's-Futter anstatt des Kontrollfutters.

Die folgenden angeführten Studien werden die Effekte von fettreicher Nahrung auf die Genexpression der *Circumvallate* Papille untersucht.

Bereits 2010 zeigte eine Studie von Chen et al. [93] ähnliche Ergebnisse wie Zhao et al. [92]. Männliche Ratten wurden in Gruppen unterteilt: Eine Kontrollgruppe und eine Gruppe, die fettreiches Futter erhielt. Die dritte Gruppe erhielt eine Diät-Beschränkung, wobei die Aufnahme an Standardfutter limitiert wurde. Die Fütterung erfolgte sechs Wochen. Die Expression von *T1R2*, *T1R3* und *GNAT3* wurde in Geschmackspapillen der *Circumvallate* Papille gemessen. Die Expression von *T1R3* wies gruppenspezifische Veränderungen auf. Bei der Gruppe, die fettreiche Nahrung erhielt, wurde eine Herunterregulation der *T1R3* Genexpression, im Vergleich mit der Kontrollgruppe, festgestellt. Ein signifikanter Unterschied wurde bei *GNAT3* zwischen der Gruppe aufgezeigt, die fettreiche Nahrung bekommen hatte und der Gruppe, die eine Diät-Beschränkung erhalten hatte. In dieser Studie wurden als Versuchstiere Ratten verwendet. Die Sequenzen der Primerpaare sind angeführt, für die Analysen wurden allerdings nicht dieselben wie in dieser Studie verwendet.

In einer weiteren Studie von Choo und Dando [4] wurden weibliche Mäuse vor und während der Schwangerschaft mit Kontrollfutter oder einer fettreichen Nahrung gefüttert. Der Nachwuchs erhielt nur Kontrollfutter, somit war der einzige Kontakt zur fettreichen Ernährung im Mutterleib. Dabei zeigten die weiblichen Nachkommen der Mäuse, welche fettreiche Nahrung erhalten hatten, signifikant erhöhte Expressionslevel des Heterodimers *T1R2* und *T1R3* im Vergleich zum Nachwuchs, dessen Mütter Kontrollfutter erhalten hatten.

Hier ist interessant, dass sich bisher lediglich bei männlichen Mäusen oder Ratten ein statistisch signifikanter Unterschied gezeigt hat. In der vorigen Studie von Choo und Dando [6] wurde die Genexpression nur bei männlichen Nachkommen analysiert. Außerdem wurden die Mäuse – wie in Punkt 1.8 beschrieben – mit Saccharose-, Sucralose-Lösung oder Wasser und Standardfutter versorgt. In der oben genannten Studie [4] war die Veränderung der Expressionslevel von *T1R2* und *T1R3* (bei Weibchen) das Resultat einer fettreichen Nahrung.

Abgeleitet aus diesen Ergebnissen kann darauf geschlossen werden, dass die Kombination von zuckerhaltigen Getränken und hochkalorischem Futter theoretisch die höchsten Effekte erzielen sollte. Die Gabe von McDonald's-Futter sollte einen möglichen Effekt verstärken. Anhand der Genexpressionsdaten wird erkannt, dass bei Markern des Typs I-III im Vergleich zur Kontrollgruppe der höchste Effekt bei den Gruppen zu verzeichnen ist die McDonald's Futter und ein mit Saccharose oder Glucose-Fructose-Sirup gesüßtes Getränk erhielten (siehe Abbildung 18). Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei den Geschmackszellen festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu ist zu erwähnen, dass in der auf Seite 79 angeführten Studie von Zhao et al. [92] die Ratten nur eine Saccharin-Lösung erhielten, worauf sich signifikante Unterschiede in der Genexpression (bei *T1R3*) ermitteln ließen.

Während bei den ermittelten Daten der Geschmackszelltypen I-III Gene hauptsächlich hinaufreguliert werden, wird bei Stamm-, Basalzellen und den Markern für alle Geschmackszelltypen eine Herunterregulation der Gene gefunden. Eine besondere Aufgabe fällt den Basalzellen zu.

Iwatsuki et al. [7] und Liu et al. [9] zeigten, dass *Shh* in Zusammenhang mit dem Wnt/ β -Catenin Signalweg steht und dadurch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Geschmackspapillen spielt. Weitere Aufgaben sind die Erneuerung von Geschmackszellen [10] und die Differenzierung dieser in die verschiedenen Typen [10].

In der kürzlich veröffentlichten Studie von Kaufman et al. [3] wurde die These formuliert, dass eine verminderte Expression, vor allem der Basal- und Stammzellen, das Vorkommen von Geschmackspapillen in der *Circumvallate* Papille reduziert und dies zu einer verminderten Geschmackswahrnehmung führt. Dabei erhielten männliche Mäuse über eine Dauer von acht Wochen eine fettreiche Ernährung, die Kontrollgruppe erhielt übliches Nagetierfutter. Im Anschluss wurden pro Geschmackszelltyp die Genexpressionswerte eines Marker untersucht. Das Resultat war eine signifikante Herunterregulation des jeweiligen Gens bei jedem Zelltyp. Die verwendeten Sequenzen der Primerpaare waren unterschiedlich, außerdem wurden in der Studie von Kaufman et al. [3] andere Markergene als in dieser Studie analysiert. Mittels RT-qPCR analysiert wurde die Genexpression von *Ki-67*, *β -Catenin*, *KCNQ1*, *Entpd2*, *PLC β 2* und *PKD2L1* untersucht.

Archer et al. [5] führten eine Studie mit weiblichen Probandinnen durch und zeigten ähnliche Ergebnisse wie Kaufman et al. [3], nämlich eine Veränderung der Genexpression in Geschmackspapillen resultierend aus einer fettreichen Ernährung. Es zeigten 62 Gene einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen adipösen und nicht adipösen Frauen. Dabei fielen vor allem die Gene *Phospholipase-C- β 2* und *Shh* mit einer reduzierten Expression, im Vergleich zu nicht adipösen Frauen, auf. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen wurde vor allem bei Genen, welche mit dem Geschmackszelltyp II in Verbindung stehen gefunden.

Eine Herunterregulation bei Geschmackszellen Typ II konnte in dieser Analyse nicht gefunden werden. Die in vorliegender Arbeit ermittelten Daten der Basalzellen und Stammzellen zeigen einige interessante Faktoren auf. Allerdings zeigten sich bei den geometrischen Mitteln der Marker der Basalzellen und Stammzellen ähnliche, aber keine signifikanten Ergebnisse.

Die Marker *Sox2* und *Ki-67* repräsentieren in dieser Studie die Stammzellen. Dabei zeigte sich, wie in Abbildung 18 erkennbar, bei allen Gruppen, die McDonald's-Futter erhielten, eine x-fache Änderung kleiner eins. Die alleinige Bewertung der Genexpressionsdaten des Gens *Ki-67* zeigte einen tendenziellen Unterschied zwischen den Gruppen CTRL + Cola AT und MCD + Cola SK ($p = 0,053$; $\alpha = 0,05$). Dabei beträgt die x-fache Änderung der Gruppe CTRL + Cola AT $1,71 \pm 1,34$ und die der Gruppe MCD + Cola SK $0,61 \pm 0,21$.

Die Repräsentanten der Basalzellen sind *Hes6* und *Shh*. Diese zeigen, bei genauerer Bewertung der einzelnen Daten, voneinander abweichende Werte. Bei alleiniger Beurteilung der Werte von *Shh* zeigt sich eine Herunterregulation des Gens im Vergleich zur Kontrollgruppe in vier von sechs Gruppen, wie bereits unter Punkt 4.2.2 erwähnt. Dabei zeigt die Durchführung einer einfaktoriellen ANOVA zwischen den Gruppen MCD + Cola AT und MCD + Cola SK einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,023$; $\alpha = 0,05$).

In Kombination mit *Hes6* zeigt sich im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser die Herunterregulation nur bei den Gruppen CTRL + Cola AT, MCD + Wasser und MCD + Cola AT. Außerdem wird anhand der Genexpressionswerte ersichtlich, dass Cola AT und Cola SK innerhalb einer Fütterungsgruppe – Kontrollfutter oder McDonald's-Futter – unterschiedliche Effekte aufzeigen.

Die Ergebnisse der oben genannten Studien [3, 5] sind das Resultat einer höchst fettreichen Ernährung bzw. der Folge daraus – Adipositas. In der hier durchgeführten Studie wurden die Mäuse mit einer hochkalorischen Kost versorgt. Die Zusammenhänge der Studien mit der vorliegenden Arbeit zeigen, dass beide ungesunden Ernährungsformen in einer Verminderung der Genexpression von Stammzellen, Basalzellen und generell Geschmackszelltypen resultieren.

Die Ergebnisse der Genexpressionsdaten der Basal- und Stammzellen von der vorliegenden Fütterungsstudie lassen darauf schließen, dass durch die fetthaltige und süße Fütterung der Versuchstiere das Vorkommen von Geschmacksknospen vermindert wird. Die Folge dessen wäre eine verminderte Geschmackswahrnehmung durch die

Abnahme an Geschmackspapillen, wodurch sich rückwirkend die Nahrungsaufnahme und die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer Folgeerkrankung erhöhen könnte.

Bei der Analyse des Transkriptoms der *Circumvallate* Papille der Maus zeigen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl Herunterregulationen als auch eine Hinaufregulationen von Genen (siehe Punkt 4.2.1).

Die Expression von acht Genen, die besonders auffällige Expressionswerte bei den cDNA-Microarray Analysen zeigten, wurde mit der RT-qPCR erneut gemessen (siehe 4.2.3).

Die Studie von Archer et al. [5], welche bereits besprochen wurde, zeigte eine Herunterregulation bei Typ II Geschmackszellen bei adipösen Frauen mit einem Body Mass Index von > 30 im Vergleich mit normalgewichtigen Frauen. Ein Effekt der Fütterung auf die Genexpression von Markern von Typ II Geschmackszellen konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Allerdings wurden in besagter Studie [5] viele weitere Gene, sowohl Marker als auch verschiedene Geschmacksrezeptoren, analysiert. Die dabei analysierten Bitterrezeptoren wurden, beim Vergleich mit nicht adipösen Frauen, herabreguliert.

In der hier vorliegenden Studie konnten, abhängig von der Fütterung der Mäuse, verschiedene Effekte auf die Expression von Bitterrezeptoren aufgezeigt werden. Die Genexpressionswerte des Bitterrezeptors *Tas2r104* zeigen zwischen den Gruppen CTRL + Cola SK und MCD + Cola AT im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,039$; $\alpha = 0,05$). Die x-fache Änderung der Gruppe CTRL + Cola SK beträgt $1,65 \pm 1,06$ und die der Gruppe MCD + Cola AT $0,38 \pm 0,18$. Zwei statistisch signifikante Unterschiede wurden außerdem bei dem Gen *Tas2r130* aufgezeigt. Im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser weist die Gruppe MCD + Cola SK einen statistisch signifikanten Unterschied zur Gruppe MCD + Wasser ($p = 0,042$; $\alpha = 0,05$) und zur Gruppe MCD + Cola AT ($p = 0,006$; $\alpha = 0,05$) auf. Die x-fachen Änderungen der Gruppen betragen: $0,67 \pm 0,42$ (MCD + Wasser), $0,29 \pm 0,09$ (MCD + Cola AT) und $1,98 \pm 1,52$ (MCD + Cola SK). Zusätzlich zu den statistisch signifikanten Werten zeigt sich beim Gen *Tas2r124* ein tendenzieller Unterschied zwischen den

Gruppen MCD + Cola AT mit einer x-fachen Änderung von $0,34 \pm 0,15$ und MCD + Cola SK ($p = 0,054$; $\alpha = 0,05$) mit einer x-fachen Änderung von $1,84 \pm 1,68$. Bei der Bewertung der Genexpressionsdaten fallen vor allem die Differenzen der x-fachen Änderungen zwischen den Gruppen MCD + Cola AT und MCD + Cola SK auf, wie in Abbildung 19 dargestellt. Interessant ist, dass hier die unterschiedlichen Effekte der Süßungsmittel klar erkennbar und bei zwei von fünf gemessenen Bitterrezeptoren, signifikant sind. In Kombination mit McDonald's-Futter zeigen die Genexpressionswerte bei Cola AT, Saccharose-Lösung, eine Herabregulierung des jeweiligen Gens verglichen mit der Gruppe CTRL + Wasser. Nach Verabreichung von Cola SK, welches mit Glucose-Fructose-Sirup gesüßt ist, zeigen die Genexpressionswerte verglichen mit der Gruppe CTRL + Wasser eine Hinaufregulation der Gene. Möglicherweise ist entweder das Verhältnis von Glucose und Fructose oder der Gehalt der Zucker in Kombination mit McDonald's-Futter entscheidend für eine Hinauf- oder Herabregulation bei Bitterrezeptoren. Der unterschiedliche Geschmack der Cola-Sorten wurde in dieser Studie nicht näher untersucht. Ein möglicher Einfluss des differentiellen Geschmacks der Cola-Sorten auf die Genexpressionslevel der *Circumvallate* Papille kann nicht ausgeschlossen werden und sollte in zukünftigen Studien erfasst werden.

Über den Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Fütterungen und der Expression von Phosphodiesterasen (*PDE6b*), Serotoninrezeptoren (*5-HTR3b*) und GLUT1 (*Slc2a1*) sind bisher nur wenige Studien bekannt.

Serotonin dient in Geschmacksknospen als Neurotransmitter. Wird eine Geschmackszelle des Typs III durch einen sauren Stimulus gereizt, steigt die Calcium Konzentration der Zelle und Serotonin und Noradrenalin wird in Vesikeln ausgeschüttet. Dabei kann Serotonin auch benachbarte Typ-II Zellen erreichen und deren ATP Sekretion hemmen [111]. Die durch differente Fütterungen implizierte verminderte Expression des Serotoninrezeptors löst möglicherweise ein Problem in der Signaltransduktion der oben genannten Mechanismen aus. Verglichen mit der Gruppe CTRL + Wasser ist die verminderte Expression in allen Gruppen, außer der Gruppe MCD + Cola SK, präsent. In der Gruppe MCD + Cola SK konnten allerdings nur zwei Datenpunkte bestimmt werden, da sich weitere Werte unterhalb der Erfassungsgrenze befanden.

Sekundäre Botenstoffe sind notwendig, um ein Signal an Effektorproteine weiterzuleiten. Wirkt ein Geschmacksstoff auf den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wird ein Zellmechanismus ausgelöst. Zum Beenden der Signaltransduktion werden Phosphodiesterasen gebildet. Wirkt ein Signalmolekül permanent ein, adaptiert sich die Zelle und mindert das Signal [12]. Eine verminderte Expression des Gens *PDE6b* zeigt sich in den Gruppen CTRL + Cola AT, MCD + Wasser und MCD + Cola AT. Eine erhöhte in der Gruppe MCD + Cola SK (Abbildung 20). Eine verminderte Expression des Gens könnte darauf hinweisen, dass durch die hochkalorische Fütterung weniger Phosphodiesterasen gebildet werden und der Zellmechanismus nicht gestoppt werden kann.

Im vorigen Absatz wird betont, dass sich die Zelle an ein dauerhaftes Signal gewöhnt und dieses mindert. Mäuse der Gruppe MCD + Cola SK zeigte hingegen eine Hinaufregulation des Gens. Mit einer mittleren x-fachen Änderung von $2,36 \pm 2,80$ zeigt sich hier eine sehr hohe Standardabweichung. Anhand der Abbildung 20 kann erkannt werden, dass sich viele Datenpunkte, ähnlich wie andere Gruppen, unterhalb von eins befinden. Eine Beeinflussung des Zellmechanismus stellt allerdings nur eine Vermutung dar, da keine signifikanten Ergebnisse aufgezeigt wurden.

Das Gen *Slc2a1* kodiert für den GLUT1-Rezeptor. Dabei handelt es sich um den am häufigsten Vorkommenden Glucosetransporter.

Die gemessenen Werte zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen CTRL + Cola AT und MCD + Wasser ($p = 0,010$; $\alpha = 0,05$) oder MCD + Cola AT ($p = 0,023$; $\alpha = 0,05$) im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser. Die x-fachen Änderung der Gruppe CTRL + Cola AT beträgt $1,28 \pm 0,53$, die der Gruppe MCD + Wasser $0,77 \pm 0,22$ und die der Gruppe MCD + Cola AT $0,80 \pm 0,14$. Dabei zeigt sich bei der Fütterung Standardfutter mit Cola AT eine hohe Expression, bei den beiden anderen hingegen eine signifikant niedrigere Genexpression. Als besonders interessant erweist sich die Tatsache, dass, obwohl genügend Glucose, in Form von Saccharose, Glucose-Fructose-Sirup und kohlenhydratreicher Ernährung, zugeführt wird, das Vorkommen des GLUT1-Rezeptors in zwei Gruppen mit McDonald's Diät, im Vergleich zur Gruppe CTRL + Cola AT, signifikant vermindert ist. Beziehungsweise in umgekehrter Ansicht die Gruppe CTRL + Cola AT im Vergleich zur Gruppe CTRL + Wasser eine besonders hohe Expression aufweist.

Hierbei ist zu beachten, dass bei der Analyse nur die cDNA der *Circumvallate* Papille verwendet wurde. Interessant wäre eine Analyse der Expression des GLUT1-Rezeptors in weiteren Körperkompartimenten.

Die Expression der mRNA kann durch verschiedene Methoden bestimmt werden. Dazu gehören unter anderem die RT-qPCR und der Microarray. Für sehr geringe Genexpressionslevel wird oft die Polymerasekettenreaktion verwendet. Pro Assay werden Informationen über die Expression von wenigen Genen erhalten. Die Microarray Analyse hingegen ist eine weit verbreitete und oft angewandte Analyse, um die Expression aller Gene gleichzeitig zu messen [112] .

In dieser Analyse wurden mit Hilfe einer zweifaktoriellen ANOVA die Daten der Analysen miteinander verglichen. Dabei wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Wie in Abbildung 22 zu erkennen ist, zeigten sich bei den x-fachen Änderungen nur wenige Unterschiede. Die unterschiedliche Erhebung der Daten hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Ergebnisse. Zu betonen ist, dass es pro Gruppe eine unterschiedliche Anzahl von Versuchstieren gab, wie unter Punkt 3.2.1 angeführt. Trotz des nur limitierten Probematerials wurden repräsentative Genexpressionsdaten analysiert.

Die durchgeführte Korrelationsanalyse zeigte einen Zusammenhang zwischen der gemessenen Genexpression von Bitterrezeptoren, dem Serotoninrezeptor 5-HT_{3b} und der Phosphodiesterase Pde6b.

Bitterrezeptoren befinden sich auf den Geschmackszellen des Typs II. Hierbei handelt es sich um G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren, die, um die Signalkaskade zu beenden, Phosphodiesterasen benötigen [12]. Das bei der Signaltransduktion ausgeschüttete ATP, von Typ-II Zellen, dient außerdem als parakriner Stimulus für die Ausschüttung von Serotonin [111].

In vorliegender Arbeit weisen der Phosphatgehalt im Plasma der Mäuse und die Expressionslevel des Serotoninrezeptors einen hohen Korrelationskoeffizienten

($R = 0,80$). Phosphat wird über die Nahrung aufgenommen und hat im Körper verschiedene Funktionen. Die Hauptzufuhrquelle von Phosphat war in der vorliegenden Fütterungsstudie, mit einem Phosphatgehalt von 6 mg/100 ml, die Cola [109]. Dabei dient es, neben der Bildung einer festen Knochen- und Zahnstruktur und der Aufrechterhaltung des pH-Wertes im Körper, als energiereiche Phosphorsäureanhydridbindung in ATP. Über ATP und Serotonin kommunizieren Typ II Zellen und Typ III Zellen miteinander [111].

Die letzten interessanten Korrelationen ergeben sich mit GLUT1. Zu erwähnen ist, dass nur ein schwacher negativer Korrelationskoeffizient ($R = -0,2$ bis $-0,3$) zwischen der Expression von GLUT1 und den Parametern BAT, PGF und WAT gefunden wurde. Es zeigt sich der höchste negative Korrelationskoeffizient bezogen auf den Parameter Gruppe. Die Gruppen wurden jeweils mit Nummern versehen, um einen Vergleich erzielen zu können. Dabei erfolgte die Nummerierung folgendermaßen: CTRL + Wasser = 1, CTRL + Cola AT = 2, CTRL + Cola SK = 3, MCD + Wasser = 4, MCD + Cola AT = 5, MCD + Cola SK = 6. Daraus lässt sich schließen, dass je hochkalorischer das Futter der Mäuse, desto niedriger die Expression des Glucosetransporters. Dies widerspiegelt die signifikanten Unterschiede der Gruppen, welche in Abbildung 21 dargestellt wurden. Außerdem zeigt sich bei hoher Expression des Transporters ein geringer Gehalt an weißem und braunem Fettgewebe. In Kombination mit dem Gruppenvergleich von GLUT1 würde dies bedeuten, dass z.B. die Kontrollgruppe die höchste Expression an GLUT1 aufweist und das braune und weiße Fettgewebe hier am geringsten sind.

6. Schlussbetrachtung

Im folgenden Abschnitt werden die wesentlichen Aussagen und Erkenntnisse dieser Arbeit analysiert, bevor diese im nächsten Kapitel zusammengefasst werden.

Die Prävalenz von Übergewicht und Adipositas steigt von Jahr zu Jahr. Inzwischen sind im europäischen Raum über 50 % aller Männer und Frauen übergewichtig. Zusätzlich leiden weltweit 23 % der Frauen und 20 % der Männer an Adipositas [11]. Es entstehen Folgeerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs [2]. Die Ursache deren ist eine positive Energiebilanz, sprich zu wenig Bewegung und eine zu hohe Zufuhr an Energie. Abhängig davon, was unserem Körper zugeführt wird, sind ebenfalls Folgen, welche unsere Nachkommen betreffen, bekannt [113, 114]. Das Vorkommen der verschiedenen Geschmackszelltypen innerhalb der Geschmacksknospen könnte einen Einfluss auf die Nahrungsaufnahme und auf die Geschmackswahrnehmung haben. Durch solche Modifikationen könnte das zukünftige Essverhalten beeinflusst werden, wodurch es rückwirkend zur Entwicklung von Folgeerkrankungen kommen könnte.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung war es zunächst das Ziel eine Methode zu entwickeln, um die RNA aus gefrorenen Mäusezungen zu isolieren (siehe 4.1). In zahlreichen Studien wurden mit bekannten Arbeitsweisen gearbeitet [3, 6, 92, 93]. Mit diesen Arbeitsschritten wurde, aufgrund der Etablierung dieser Methode, anfangs gearbeitet.

Zunächst wurde die Gewebeaufarbeitung der gefrorenen Zunge optimiert. Dabei wurde festgestellt, dass die übliche Aufarbeitung, welche in den oben genannten Studien genutzt wurde, der gefrorenen Gewebestücke keine bzw. keine auswertbaren Ergebnisse lieferte.

Nachdem systematischen Eliminieren von Fehlerfaktoren wurde letztendlich eine Möglichkeit entwickelt, um die RNA der *Circumvallate* Papille zu isolieren. Es fand eine Optimierung der RNA-Isolierung, der cDNA-Synthese und der RT-qPCR statt. Aufgrund der qualitativ und quantitativ guten Ergebnisse, welche mit Hilfe der Kits des Herstellers NEB erzielt wurden, wurde bei der Genexpressionsanalyse der Studienproben mit diesen gearbeitet (siehe 4.1.2).

Im zweiten Schritt der Arbeit wurden die Genexpressionslevel der unterschiedlich hochkalorisch gefütterten Mäuse analysiert. Zunächst wurden cDNA-Microarrays durchgeführt, um einen Überblick über das Transkriptom der Maus zu erhalten. Dabei wurden bereits einige interessante Faktoren festgestellt.

Bezogen auf das gesamte Transkriptom der Maus wurden gruppenspezifische Unterschiede ermittelt. Dabei zeigten sich sowohl zwischen den Fütterungsarten Kontrollfutter und McDonald's-Futter als auch zwischen den unterschiedlichen Getränken differentielle Genexpressionsdaten. Durch Auswertung der Daten in Form einer Heatmap (Abbildung 15-Abbildung 17) wurden spezifische Unterschiede zwischen den Gruppen bei manchen Genen klar erkennbar. Hier zeigten Bitterrezeptoren, nämlich *Tas2r104*, *Tas2r106*, *Tas2r118*, *Tas2r124* und *Tas2r130*, Abweichungen von der x-fachen Änderung gleich 1. Außerdem auffällig waren die Gene die für GLUT1, PD6bE und den Serotoninrezeptor 5-HTR3b codieren. Aufgrund der deutlichen Differenzen der Gruppen wurden die oben genannten Gene genauer mittels RT-qPCR untersucht.

Außerdem wurden pro Geschmackszelltyp zwei Marker gewählt, die den jeweiligen Zelltyp in der Messung repräsentieren sollen. Dabei wurden neben Markern für die Zelltypen I-III, Basal- und Stammzellen auch Marker analysiert, welche für alle diese Geschmackszellen gelten. Die Messung der Expressionswerte von verschiedenen Markern ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Fütterungen. Wobei sich trotzdem einige interessante Übereinstimmungen mit der Literatur feststellen ließen. Kaufman et al. [3] stellten in der Studie eine verminderte Expression der Basal- und Stammzellen fest und vermuteten dadurch eine reduzierte Geschmackswahrnehmung. Ausschlaggebend dafür war eine fettreiche Ernährung über eine Dauer von acht Wochen. Die Daten der Stammzellen zeigten in allen Gruppen eine x-fache Änderung kleiner eins. *Shh* zeigte in der oben genannten Studie eine starke Herunterregulation.

Bei alleiniger Beurteilung der Werte von *Shh* in der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine Herunterregulation des Gens in beinahe allen Gruppen. Ein statistisch signifikanter Unterschied bei dem Gen *Shh* wurde zwischen den Gruppen MCD + Cola AT und MCD + Cola SK festgestellt. Diese Signifikanz war nach Bildung des geometrischen Mittels mit dem Marker *Hes6* nicht mehr gegeben. Durch die Berechnung des geometrischen Mittels zeigt sich bei den Basalzellen die Herunterregulation nur bei den Gruppen CTRL + Cola AT, MCD + Wasser und MCD + Cola AT.

Durch diese Erkenntnisse könnte darauf geschlossen werden, dass nicht nur eine fettreiche Diät – entsprechend der Fütterung in den angeführten Studien [3, 5] – die

Anzahl an Geschmacksknospen vermindert und dadurch die Geschmackswahrnehmung reduziert, sondern auch eine Kombination aus süßer und fettreicher Ernährung, wie in der vorliegenden Fütterungsstudie. Für diese Vermutung sollten allerdings noch weitere Fütterungsstudien mit einer hochkalorischen Nahrungszufuhr durchgeführt werden.

Die Messung der Gene, die bei der Analyse der Microarraydaten herausstachen, zeigte einige signifikante Unterschiede. Dabei wurden bei den Bitterrezeptoren *Tas2r104* und *Tas2r130* gleich drei signifikante Unterschiede gefunden. Außerdem zeigte das Gen *Slc2a1*, das für den Glucosetransporter GLUT1 codiert, signifikante von der Fütterung abhängige Unterschiede. Die genauere Bedeutung dieser sollte in weiteren Experimenten genauer analysiert werden.

Die durchgeführte Korrelationsanalyse zeigte einige interessante Korrelationen, vor allem im Bereich Signaltransduktion, auf. Eine hohe Korrelation wiesen Bitterrezeptoren, der Serotoninrezeptor und eine Phosphodiesterase auf. Bitterrezeptoren befinden sich auf Geschmackszellen des Typ II [32–34]. Als Folge der Aktivierung von Bitterrezeptoren wird von Typ II Zellen der Neurotransmitter ATP ausgeschüttet. Dieser dient als parakriner Stimulus für die Ausschüttung von Serotonin auf Typ III Zellen [74]. Der höchste Korrelationskoeffizient (0,80) zeigte sich zwischen dem Parameter Phosphatgehalt im Plasma der Mäuse und der Genexpression des Serotoninrezeptors. Dabei weist Cola einen Phosphatgehalt von 6 mg/100ml auf.

Weitere interessante Ergebnisse zeigten eine Korrelationen mit GLUT1, wobei hier zu erwähnen ist, dass nur ein schwacher negativer Korrelationskoeffizient ($R = -0,2$ bis $-0,3$) zwischen der Expression von GLUT1 und den folgenden Parametern gefunden wurde. Die Kombination einer süßen und fettreichen Fütterung führte in dieser Arbeit bei den Mäusen zu einer niedrigeren Expression des Glucosetransporters und zu einem hohen Anteil an braunem und weißem Fettgewebe.

Als Fazit der erhaltenen Daten kann darauf geschlossen werden, dass die hochkalorische Fütterung möglicherweise einen Einfluss auf die Genexpression hat. Dabei zeigten sich hier einige interessante Ergebnisse, welche in der Literatur teilweise bestätigt werden konnten. Allerdings ist zu erwähnen, dass nicht alle erhaltenen Daten einen statistisch signifikanten Unterschied zeigten. Ebenfalls interessant wäre die Analyse der Genexpression in weiteren Geweben, wie z.B. im Magen-Darm-Trakt.

7. Zusammenfassung

Der Geschmackssinn dient zur Auswahl und Identifikation von Nahrung. Vermittelt wird dieser über Geschmacksknospen, welche sich verstreut auf unserer Zunge befinden. Die Wallpapille liegt am hinteren Teil der Zunge, sie beherbergt die meisten Knospen. Bisher zeigten verschiedene Ernährungsformen einen Einfluss auf die Expression von für die Geschmackswahrnehmung relevanten Genen in dieser Papille. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigten außerdem, dass das Vorkommen von Geschmacksknospen durch die Nahrung beeinträchtigt werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Fragestellung untersucht, ob eine hochkalorische Ernährung entsprechend westlicher Ernährungsgewohnheiten eine Veränderung der Expression von für die Geschmackswahrnehmung relevanten Genen in der *Circumvallate* Papille von Mäusen bewirken kann.

Mäuse erhielten für 24 Wochen unterschiedliche hochkalorische Diäten. Im ersten Schritt der Arbeit wurde eine Methode zur RNA-Isolierung von gefrorenen Mäusezungen etabliert. Nach der Optimierung der Methode wurden im zweiten Schritt cDNA-Microarrays durchgeführt und Zelltyp-spezifische Marker der Geschmacksknospen analysiert. Beim Gruppenvergleich der geometrischen Mittel der Zelltyp-spezifischen Marker wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Bei alleiniger Bewertung der Genexpressionswerte des Basalzellenmarkers *Shh* wurde ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Fütterungsgruppen festgestellt ($p \leq 0,05$). Interessante Resultate zeigten sich bei der RT-qPCR Messung von Genen, welche anhand der Ergebnisse der cDNA-Microarrays ausgewählt wurden. Dabei zeigte sich durch die westliche Ernährungsform eine Beeinflussung von Bitterrezeptoren. Die Genexpression der Rezeptoren *Tas2r104* ($p \leq 0,05$) und *Tas2r130* ($p \leq 0,01$) wiesen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Fütterungsgruppen auf. Der Glucosetransporter GLUT1 zeigte signifikante Unterschiede zwischen drei Gruppen. Außerdem wurden anhand einer Pearson-Korrelationsanalyse mehrere Zusammenhänge zwischen den Genexpressionslevel von analysierten Markern und gemessenen Markern der Körperzusammensetzung, des Körpergewichtes und des Stoffwechsels aufgezeigt.

Der exakte Zusammenhang zwischen einer hochkalorischen Ernährung und der Genexpression von Zelltyp-spezifischen Markern bzw. von in der Geschmackstransduktion wichtige Komponenten sollte zukünftig aufgeklärt werden.

8. Abstract

The sense of taste is necessary to select and identify food. Taste buds are located all over our tongue and convey the sense of taste. The *circumvallate papillae* is placed at the posterior of the tongue containing the most taste buds. Various diets have revealed an impact on the expression of taste-relevant genes in this papilla. Recently published studies point to a correlation between food intake and the appearance of taste buds. The aim of this work was to analyze whether a high-caloric diet induces a change of the expression of taste-relevant genes in the *circumvallate papillae* of mice.

Mice were fed different high-caloric diets for a period of 24 weeks. First, we established a method to isolate the RNA of frozen tongues. After establishing an optimized working technique, we focused on gene expression analysis. There were no significant group-specific differences in the geometric mean of the taste cell markers. The gene expression values of the basal cell marker *Shh* were significantly different in two feeding groups ($p \leq 0,05$). Based on the results from the cDNA-microarrays gene expression levels of selected genes were determined using the RT-qPCR. Bitter receptors like *Tas2r104* ($p \leq 0,05$) and *Tas2r130* ($p \leq 0,01$) were influenced significantly by the diets. The glucose transporter GLUT1 showed significant differences in three out of six groups. The Pearson correlation analysis revealed connections between the gene expression levels of taste cell specific markers and markers of body composition, body weight and metabolism.

This work reveals new insights and confirms previous findings. Nevertheless, further investigations are necessary to link a high-caloric diet and the gene expression of specific markers or important components in taste transduction.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Ellrott, T., Psychologie der Ernährung. *Aktuelle Ernährungsmedizin* 2012, 37, 155–167.
- [2] World Health Organization, *Obesity: WHO approaches to obesity*, www.euro.who.int/ (accessed October 11, 2019).
- [3] Kaufman, A., Kim, J., Noel, C., Dando, R., Taste loss with obesity in mice and men. *International Journal of Obesity* 2019. doi:10.1038/s41366-019-0429-6.
- [4] Choo, E., Dando, R., Maternal Obesity Increases Sweet Taste Response and Sweet Taste Receptor mRNA Expression in Adult Offspring. *FASEB Journal* 2017.
- [5] Archer, N., Shaw, J., Cochet-Broch, M., Bunch, R. et al., Obesity is associated with altered gene expression in human tastebuds. *International Journal of Obesity* 2019, 43, 1475–1484.
- [6] Choo, E., Dando, R., No detriment in taste response or expression in offspring of mice fed representative levels of sucrose or non-caloric sucralose while pregnant. *Physiology & Behavior* 2018, 184, 39–45.
- [7] Iwatsuki, K., Liu, H.-X., Grönder, A., Singer, M. A. et al., Wnt signaling interacts with Shh to regulate taste papilla development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104, 2253–2258.
- [8] Liu, F., Thirumangalathu, S., Gallant, N. M., Yang, S. H. et al., Wnt-beta-catenin signaling initiates taste papilla development. *Nature Genetics* 2007, 39, 106–112.
- [9] Gaillard, D., Barlow, L. A., Taste bud cells of adult mice are responsive to Wnt/ β -catenin signaling: implications for the renewal of mature taste cells. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 2011, 49, 295–306.
- [10] Gaillard, D., Xu, M., Liu, F., Millar, S. E., Barlow, L. A., β -Catenin Signaling Biases Multipotent Lingual Epithelial Progenitors to Differentiate and Acquire Specific Taste Cell Fates. *PLOS Genetics* 2015, 11, e1005208.
- [11] World Health Organization, *Obesity: Data and statistics*, www.euro.who.int/ (accessed October 12, 2019).
- [12] Christen, P., Jaussi, R., Benoit, R., *Biochemie und Molekularbiologie: Eine Einführung in 40 Lerneinheiten*, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg 2016.
- [13] Frings, S., Müller, F., *Biologie der Sinne: Vom Molekül zur Wahrnehmung* 2019.

- [14] Müller, W. A., Frings, S., Möhrle, F., *Tier- und Humanphysiologie: Eine Einführung* 2019.
- [15] Hummel, T., Welge-Lüssen, A. (Eds.), *Riech- und Schmeckstörungen*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2009.
- [16] Smith, D. V., Margolskee, R. F., Making Sense of Taste. *Scientific American* 2006, 16, 84–92.
- [17] Murray, R. G., Cellular relations in mouse *circumvallate* taste buds. *Microscopy Research and Technique* 1993, 26, 209–224.
- [18] Pumplun, D. W., Yu, C., Smith, D. V., Light and dark cells of rat vallate taste buds are morphologically distinct cell types. *The Journal of Comparative Neurology* 1997, 378, 389–410.
- [19] Bartel, D. L., Sullivan, S. L., Lavoie, E. G., Sévigny, J., Finger, T. E., Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds. *The Journal of Comparative Neurology* 2006, 497, 1–12.
- [20] Vandenbeuch, A., Anderson, C. B., Parnes, J., Enjoji, K. et al., Role of the ectonucleotidase NTPDase2 in taste bud function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, 110, 14789–14794.
- [21] Halpern, B. P., Amiloride and vertebrate gustatory responses to NaCl. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 1998, 23, 5–47.
- [22] Heck, G. L., Mierson, S., DeSimone, J. A., Salt taste transduction occurs through an amiloride-sensitive sodium transport pathway. *Science (New York, N.Y.)* 1984, 223, 403–405.
- [23] Oka, Y., Butnaru, M., Buchholtz, L. von, Ryba, N. J. P., Zuker, C. S., High salt recruits aversive taste pathways. *Nature* 2013, 494, 472–475.
- [24] Chandrashekar, J., Kuhn, C., Oka, Y., Yarmolinsky, D. A. et al., The cells and peripheral representation of sodium taste in mice. *Nature* 2010, 464, 297–301.
- [25] Lawton, D. M., Furness, D. N., Lindemann, B., Hackney, C. M., Localization of the glutamate-aspartate transporter, GLAST, in rat taste buds. *The European Journal of Neuroscience* 2000, 12, 3163–3171.
- [26] Roper, S. D., Chaudhari, N., Taste buds: cells, signals and synapses. *Nature Reviews Neuroscience* 2017, 18, 485–497.

- [27] Matsunami, H., Montmayeur, J. P., Buck, L. B., A family of candidate taste receptors in human and mouse. *Nature* 2000, *404*, 601–604.
- [28] Behrens, M., Foerster, S., Staehler, F., Raguse, J.-D., Meyerhof, W., Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells. *The Journal of Neuroscience* 2007, *27*, 12630–12640.
- [29] Kim, M.-R., Kusakabe, Y., Miura, H., Shindo, Y. et al., Regional expression patterns of taste receptors and gustducin in the mouse tongue. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, *312*, 500–506.
- [30] Stone, L. M., Barrows, J., Finger, T. E., Kinnamon, S. C., Expression of T1Rs and gustducin in palatal taste buds of mice. *Chemical Senses* 2007, *32*, 255–262.
- [31] Hoon, M. A., Adler, E., Lindemeier, J., Battey, J. F. et al., Putative Mammalian Taste Receptors. *Cell* 1999, *96*, 541–551.
- [32] Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L. et al., Coding of Sweet, Bitter, and Umami Tastes. *Cell* 2003, *112*, 293–301.
- [33] Clapp, T. R., Yang, R., Stoick, C. L., Kinnamon, S. C., Kinnamon, J. C., Morphologic characterization of rat taste receptor cells that express components of the phospholipase C signaling pathway. *The Journal of Comparative Neurology* 2004, *468*, 311–321.
- [34] DeFazio, R. A., Dvoryanchikov, G., Maruyama, Y., Kim, J. W. et al., Separate populations of receptor cells and presynaptic cells in mouse taste buds. *The Journal of Neuroscience* 2006, *26*, 3971–3980.
- [35] Tomchik, S. M., Berg, S., Kim, J. W., Chaudhari, N., Roper, S. D., Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds. *The Journal of Neuroscience* 2007, *27*, 10840–10848.
- [36] Yoshida, R., Miyauchi, A., Yasuo, T., Jyotaki, M. et al., Discrimination of taste qualities among mouse fungiform taste bud cells. *The Journal of Physiology* 2009, *587*, 4425–4439.
- [37] Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y. et al., Mammalian Sweet Taste Receptors. *Cell* 2001, *106*, 381–390.
- [38] Nelson, G., Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Feng, L. et al., An amino-acid taste receptor. *Nature* 2002, *416*, 199–202.

- [39] Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J. et al., The Receptors for Mammalian Sweet and Umami Taste. *Cell* 2003, *115*, 255–266.
- [40] Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z. et al., Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science (New York, N.Y.)* 2003, *301*, 850–853.
- [41] Treesukosol, Y., Smith, K. R., Spector, A. C., The functional role of the T1R family of receptors in sweet taste and feeding. *Physiology & Behavior* 2011, *105*, 14–26.
- [42] Yee, K. K., Sukumaran, S. K., Kotha, R., Gilbertson, T. A., Margolskee, R. F., Glucose transporters and ATP-gated K⁺ (KATP) metabolic sensors are present in type 1 taste receptor 3 (T1r3)-expressing taste cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011, *108*, 5431–5436.
- [43] Sukumaran, S. K., Yee, K. K., Iwata, S., Kotha, R. et al., Taste cell-expressed α -glucosidase enzymes contribute to gustatory responses to disaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016, *113*, 6035–6040.
- [44] Yamaguchi, S., Basic properties of umami and effects on humans. *Physiology & Behavior* 1991, *49*, 833–841.
- [45] Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K. et al., Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, *99*, 4692–4696.
- [46] Chaudhari, N., Landin, A. M., Roper, S. D., A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor. *Nature Neuroscience* 2000, *3*, 113–119.
- [47] Chaudhari, N., Pereira, E., Roper, S. D., Taste receptors for umami: the case for multiple receptors. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2009, *90*, 738S-742S.
- [48] San Gabriel, A., Maekawa, T., Uneyama, H., Torii, K., Metabotropic glutamate receptor type 1 in taste tissue. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2009, *90*, 743S-746S.
- [49] Yasumatsu, K., Manabe, T., Yoshida, R., Iwatsuki, K. et al., Involvement of multiple taste receptors in umami taste: analysis of gustatory nerve responses in metabotropic glutamate receptor 4 knockout mice. *The Journal of Physiology* 2015, *593*, 1021–1034.

- [50] Conte, C., Ebeling, M., Marcuz, A., Nef, P., Andres-Barquin, P. J., Evolutionary relationships of the Tas2r receptor gene families in mouse and human. *Physiological Genomics* 2003, 14, 73–82.
- [51] Meyerhof, W., Behrens, M., Brockhoff, A., Bufe, B., Kuhn, C., Human bitter taste perception. *Chemical Senses* 2005, 30 Suppl. 1, i14-5.
- [52] Meyerhof, W., Batram, C., Kuhn, C., Brockhoff, A. et al., The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors. *Chemical Senses* 2010, 35, 157–170.
- [53] Shi, P., Zhang, J., Yang, H., Zhang, Y.-P., Adaptive diversification of bitter taste receptor genes in Mammalian evolution. *Molecular Biology and Evolution* 2003, 20, 805–814.
- [54] Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J. et al., A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell* 2000, 100, 693–702.
- [55] Huang, Y. A., Maruyama, Y., Stimac, R., Roper, S. D., Presynaptic (Type III) cells in mouse taste buds sense sour (acid) taste. *The Journal of Physiology* 2008, 586, 2903–2912.
- [56] Huang, A. L., Chen, X., Hoon, M. A., Chandrashekar, J. et al., The cells and logic for mammalian sour taste detection. *Nature* 2006, 442, 934–938.
- [57] Ye, W., Chang, R. B., Bushman, J. D., Tu, Y.-H. et al., The K⁺ channel KIR2.1 functions in tandem with proton influx to mediate sour taste transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016, 113, E229-38.
- [58] Lyall, V., Alam, R. I., Phan, D. Q., Ereso, G. L. et al., Decrease in rat taste receptor cell intracellular pH is the proximate stimulus in sour taste transduction. *American journal of physiology. Cell Physiology* 2001, 281, C1005-13.
- [59] Chang, R. B., Waters, H., Liman, E. R., A proton current drives action potentials in genetically identified sour taste cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010, 107, 22320–22325.
- [60] Richter, T. A., Caicedo, A., Roper, S. D., Sour taste stimuli evoke Ca²⁺ and pH responses in mouse taste cells. *The Journal of Physiology* 2003, 547, 475–483.
- [61] Ishimaru, Y., Inada, H., Kubota, M., Zhuang, H. et al., Transient receptor potential family members PKD1L3 and PKD2L1 form a candidate sour taste receptor.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006, 103, 12569–12574.

- [62] Tu, Y.-H., Cooper, A. J., Teng, B., Chang, R. B. et al., An evolutionarily conserved gene family encodes proton-selective ion channels. *Science (New York, N.Y.)* 2018, 359, 1047–1050.
- [63] Ramsey, I. S., DeSimone, J. A., Otopetrin-1: A sour-tasting proton channel. *The Journal of General Physiology* 2018, 150, 379–382.
- [64] Yang, R., Crowley, H. H., Rock, M. E., Kinnamon, J. C., Taste cells with synapses in rat *circumvallate papillae* display SNAP-25-like immunoreactivity. *The Journal of Comparative Neurology* 2000, 424, 205–215.
- [65] Chandrashekar, J., Yarmolinsky, D., Buchholtz, L. von, Oka, Y. et al., The taste of carbonation. *Science (New York, N.Y.)* 2009, 326, 443–445.
- [66] Feng, P., Huang, L., Wang, H., Taste bud homeostasis in health, disease, and aging. *Chemical Senses* 2014, 39, 3–16.
- [67] Hall, J. M.H., Bell, M. L., Finger, T. E., Disruption of sonic hedgehog signaling alters growth and patterning of lingual taste papillae. *Developmental Biology* 2003, 255, 263–277.
- [68] Miura, H., Kusakabe, Y., Sugiyama, C., Kawamatsu, M. et al., Shh and Ptc are associated with taste bud maintenance in the adult mouse. *Mechanisms of Development* 2001, 106, 143–145.
- [69] Seta, Y., Stoick-Cooper, C. L., Toyono, T., Kataoka, S. et al., The bHLH transcription factors, Hes6 and Mash1, are expressed in distinct subsets of cells within adult mouse taste buds. *Archives of Histology and Cytology* 2006, 69, 189–198.
- [70] Okubo, T., Pevny, L. H., Hogan, B. L. M., Sox2 is required for development of taste bud sensory cells. *Genes & Development* 2006, 20, 2654–2659.
- [71] Hamamichi, R., Asano-Miyoshi, M., Emori, Y., Taste bud contains both short-lived and long-lived cell populations. *Neuroscience* 2006, 141, 2129–2138.
- [72] Bo, X., Alavi, A., Xiang, Z., Oglesby, I. et al., Localization of ATP-gated P2X2 and P2X3 receptor immunoreactive nerves in rat taste buds. *Neuroreport* 1999, 10, 1107–1111.

- [73] Finger, T. E., Danilova, V., Barrows, J., Bartel, D. L. et al., ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves. *Science (New York, N.Y.)* 2005, 310, 1495–1499.
- [74] Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Dvoryanchikov, G., Pereira, E. et al., The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104, 6436–6441.
- [75] Romanov, R. A., Rogachevskaja, O. A., Bystrova, M. F., Jiang, P. et al., Afferent neurotransmission mediated by hemichannels in mammalian taste cells. *The EMBO Journal* 2007, 26, 657–667.
- [76] Huang, Y. A., Stone, L. M., Pereira, E., Yang, R. et al., Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds. *The Journal of Neuroscience* 2011, 31, 13654–13661.
- [77] Huang, Y. A., Dando, R., Roper, S. D., Autocrine and paracrine roles for ATP and serotonin in mouse taste buds. *The Journal of Neuroscience* 2009, 29, 13909–13918.
- [78] Taruno, A., Vingtdeux, V., Ohmoto, M., Ma, Z. et al., CALHM1 ion channel mediates purinergic neurotransmission of sweet, bitter and umami tastes. *Nature* 2013, 495, 223–226.
- [79] Dando, R., Dvoryanchikov, G., Pereira, E., Chaudhari, N., Roper, S. D., Adenosine enhances sweet taste through A2B receptors in the taste bud. *The Journal of Neuroscience* 2012, 32, 322–330.
- [80] Huang, Y.-J., Maruyama, Y., Lu, K.-S., Pereira, E. et al., Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. *The Journal of Neuroscience* 2005, 25, 843–847.
- [81] Dvoryanchikov, G., Tomchik, S. M., Chaudhari, N., Biogenic amine synthesis and uptake in rodent taste buds. *The Journal of Comparative Neurology* 2007, 505, 302–313.
- [82] Kim, D. J., Roper, S. D., Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *The Journal of Comparative Neurology* 1995, 353, 364–370.
- [83] Nada, O., Hirata, K., The monoamine-containing cell in the gustatory epithelium of some vertebrates. *Archivum Histologicum Japonicum* 1977, 40 Suppl, 197–206.

- [84] Huang, Y. A., Pereira, E., Roper, S. D., Acid stimulation (sour taste) elicits GABA and serotonin release from mouse taste cells. *PLoS one* 2011, 6, e25471.
- [85] Vandenbeuch, A., Zorec, R., Kinnamon, S. C., Capacitance measurements of regulated exocytosis in mouse taste cells. *The Journal of Neuroscience* 2010, 30, 14695–14701.
- [86] Obata, H., Shimada, K., Sakai, N., Saito, N., GABAergic neurotransmission in rat taste buds: immunocytochemical study for GABA and GABA transporter subtypes. *Molecular Brain Research* 1997, 49, 29–36.
- [87] Dvoryanchikov, G., Huang, Y. A., Barro-Soria, R., Chaudhari, N., Roper, S. D., GABA, its receptors, and GABAergic inhibition in mouse taste buds. *The Journal of Neuroscience* 2011, 31, 5782–5791.
- [88] Paran, N., Mattern, C. F., The distribution of acetylcholinesterase in buds of the rat vallate papilla as determined by electron microscope histochemistry. *The Journal of Comparative Neurology* 1975, 159, 29–44.
- [89] Dando, R., Roper, S. D., Acetylcholine is released from taste cells, enhancing taste signalling. *The Journal of physiology* 2012, 590, 3009–3017.
- [90] Huang, Y. A., Maruyama, Y., Roper, S. D., Norepinephrine is coreleased with serotonin in mouse taste buds. *The Journal of Neuroscience* 2008, 28, 13088–13093.
- [91] AGES, *Ernährung: Die Österreichische Ernährungspyramide*, www.ages.at/themen/ernaehrung/oesterreichische-ernaehrungspyramide/ (accessed November 22, 2019).
- [92] Zhao, X., Yan, J., Chen, K., Song, L. et al., Effects of saccharin supplementation on body weight, sweet receptor mRNA expression and appetite signals regulation in post-weanling rats. *Peptides* 2018, 107, 32–38.
- [93] Chen, K., Yan, J., Suo, Y., Li, J. et al., Nutritional status alters saccharin intake and sweet receptor mRNA expression in rat taste buds. *Brain Research* 2010, 1325, 53–62.
- [94] Hewitt, K. N., Pratis, K., Jones, M. E. E., Simpson, E. R., Estrogen replacement reverses the hepatic steatosis phenotype in the male aromatase knockout mouse. *Endocrinology* 2004, 145, 1842–1848.

- [95] Tizzano, M., Dvoryanchikov, G., Barrows, J. K., Kim, S. et al., Expression of Galpha14 in sweet-transducing taste cells of the posterior tongue. *BMC Neuroscience* 2008, 9, 110.
- [96] Rohm, B., Holik, A.-K., Somoza, M. M., Pignitter, M. et al., Nonivamide, a capsaicin analog, increases dopamine and serotonin release in SH-SY5Y cells via a TRPV1-independent pathway. *Molecular Nutrition & Food Research* 2013, 57, 2008–2018.
- [97] Holik, A.-K., Lieder, B., Kretschy, N., Somoza, M. M. et al., N(ε) - Carboxymethyllysine Increases the Expression of miR-103/143 and Enhances Lipid Accumulation in 3T3-L1 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2016, 117, 2413–2422.
- [98] McCallum, L. A., Pierce, S. L., England, S. K., Greenwood, I. A., Tribe, R. M., The contribution of Kv7 channels to pregnant mouse and human myometrial contractility. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 2011, 15, 577–586.
- [99] Lossow, K., Hübner, S., Roudnitzky, N., Slack, J. P. et al., Comprehensive Analysis of Mouse Bitter Taste Receptors Reveals Different Molecular Receptive Ranges for Orthologous Receptors in Mice and Humans. *The Journal of Biological Chemistry* 2016, 291, 15358–15377.
- [100] Reinard, T., *Molekularbiologische Methoden 2.0*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart 2018.
- [101] Jansohn, M., Rothhämel, S., *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2012.
- [102] Singh-Gasson, S., Green, R. D., Yue, Y., Nelson, C. et al., Maskless fabrication of light-directed oligonucleotide microarrays using a digital micromirror array. *Nature Biotechnology* 1999, 17, 974–978.
- [103] Agbavwe, C., Kim, C., Hong, D., Heinrich, K. et al., Efficiency, error and yield in light-directed maskless synthesis of DNA microarrays. *Journal of Nanobiotechnology* 2011, 9, 57.
- [104] Yoshida, R., Takai, S., Sanematsu, K., Margolskee, R. F. et al., Bitter Taste Responses of Gustducin-positive Taste Cells in Mouse Fungiform and Circumvallate Papillae. *Neuroscience* 2018, 369, 29–39.

- [105] Perea-Martinez, I., Nagai, T., Chaudhari, N., Functional cell types in taste buds have distinct longevities. *PLoS one* 2013, 8, e53399.
- [106] Venkatesan, N., Boggs, K., Liu, H.-X., Taste Bud Labeling in Whole Tongue Epithelial Sheet in Adult Mice. *Tissue Engineering. Part C, Methods* 2016, 22, 332–337.
- [107] Ma, H., Yang, R., Thomas, S. M., Kinnamon, J. C., Qualitative and quantitative differences between taste buds of the rat and mouse. *BMC Neuroscience* 2007, 8, 5.
- [108] Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E. et al., T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell* 2000, 100, 703–711.
- [109] Nährwerte von Lebensmitteln: Österreichische Nährwerttabelle und Bundeslebensmittelschlüssel, *nutritional.software*.
- [110] Xu, H., Staszewski, L., Tang, H., Adler, E. et al., Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, 101, 14258–14263.
- [111] Schling, P., *Der Geschmack: Von Genen, Molekülen und der faszinierenden Biologie eines der grundlegendsten Sinne*, Springer Fachmedien Wiesbaden, Wiesbaden 2019.
- [112] Etienne, W., Meyer, M. H., Peppers, J., Meyer, R. A., Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. *BioTechniques* 2004, 36, 618–20, 622, 624–6.
- [113] Bultman, S. J., Michaud, E. J., Woychik, R. P., Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 1992, 71, 1195–1204.
- [114] Waterland, R. A., Jirtle, R. L., Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Molecular and cellular biology* 2003, 23, 5293–5300.

Anhang

N0-Werte von T1R2 (c = 50 nM) der Gewebeaufarbeitung

<i>Mit Enzymmix</i>	<i>Ohne Enzymmix</i>	<i>Mit RNAlater-ICE</i>	<i>Ohne RNAlater-ICE</i>
<i>8,49E-10</i>	-	<i>2,28E-11</i>	<i>2,34E-10</i>
<i>8,51E-10</i>	-	<i>6,28E-11</i>	<i>2,79E-10</i>
<i>6,98E-10</i>	-	<i>4,91E-11</i>	<i>3,34E-10</i>

N0-Werte von T1R3 (c = 100 nM) der Gewebeaufarbeitung

<i>Mit Enzymmix</i>	<i>Ohne Enzymmix</i>	<i>Mit RNAlater-ICE</i>	<i>Ohne RNAlater-ICE</i>
<i>6,12E-10</i>	-	<i>2,50E-10</i>	<i>1,55E-09</i>
<i>5,07E-10</i>	-	<i>2,49E-10</i>	<i>9,72E-10</i>
<i>4,51E-10</i>	-	<i>2,40E-10</i>	<i>9,79E-10</i>

N0-Werte von GNAT3 (c = 100 nM) der Gewebeaufarbeitung

<i>Mit Enzymmix</i>	<i>Ohne Enzymmix</i>	<i>Mit RNAlater-ICE</i>	<i>Ohne RNAlater-ICE</i>
<i>2,85E-10</i>	-	<i>6,29E-11</i>	<i>8,70E-11</i>
<i>3,49E-10</i>	-	<i>5,14E-11</i>	<i>1,46E-10</i>
<i>2,66E-10</i>	-	-	<i>8,34E-11</i>

N0-Werte von ACTB (c = 100 nM) der Gewebeaufarbeitung

<i>Mit Enzymmix</i>	<i>Ohne Enzymmix</i>	<i>Mit RNAlater-ICE</i>	<i>Ohne RNAlater-ICE</i>
<i>1,01E-08</i>	<i>5,78E-11</i>	<i>1,17E-09</i>	<i>2,06E-09</i>
<i>1,19E-08</i>	<i>3,21E-11</i>	<i>1,41E-09</i>	<i>3,22E-09</i>
<i>1,03E-08</i>	<i>2,35E-11</i>	<i>1,81E-09</i>	<i>3,26E-09</i>

N0-Werte der Gene T1R2, T1R3, GNAT3 und ACTB bei Verwendung der NEB-Kits

<i>T1R2</i> <i>[c = 50 nM]</i>	<i>T1R3</i> <i>[c = 100 nM]</i>	<i>GNAT3</i> <i>[c = 100 nM]</i>	<i>ACTB</i> <i>[c = 100 nM]</i>
<i>4,36E-08</i>	<i>6,71E-08</i>	<i>2,61E-07</i>	<i>3,67E-06</i>
<i>3,95E-08</i>	<i>6,68E-08</i>	<i>2,46E-07</i>	<i>3,57E-06</i>
<i>3,31E-08</i>	<i>7,83E-08</i>	<i>2,78E-07</i>	<i>3,44E-06</i>

Gruppierung der Versuchstiere

ID	Gruppe	Land
26	CTRL+water	-----
27	CTRL+water	-----
28	CTRL+water	-----
29	CTRL+water	-----
30	CTRL+water	-----
31	CTRL+water	-----
92	CTRL+water	-----
94	CTRL+water	-----
58	CTRL+water	-----
71	CTRL+water	-----
54	CTRL+water	-----
9	CTRL+cola	SVK
8	CTRL+cola	SVK
11 (63)	CTRL+cola	SVK
12	CTRL+cola	SVK
13	CTRL+cola	SVK
15	CTRL+cola	SVK
17	CTRL+cola	SVK
18	CTRL+cola	SVK
96	CTRL+cola	AUT
95	CTRL+cola	AUT
97	CTRL+cola	AUT
3	CTRL+cola	SVK
2	CTRL+cola	SVK
5	CTRL+cola	SVK
7	CTRL+cola	SVK

19	CTRL+cola	AUT
21	CTRL+cola	AUT
22	CTRL+cola	AUT
23	CTRL+cola	AUT
37	MC+water	-----
60	MC+water	-----
49	MC+water	-----
43	MC+water	-----
44	MC+water	-----
102	MC+water	-----
85	MC+water	-----
36	MC+water	-----
61	MC+cola	AUT
65	MC+cola	AUT
66	MC+cola	AUT
75	MC+cola	SVK
76	MC+cola	SVK
77	MC+cola	SVK
68	MC+cola	SVK
72	MC+cola	SVK
73	MC+cola	SVK
84	MC+cola	SVK
80	MC+cola	AUT
79	MC+cola	AUT
81	MC+cola	AUT
83	MC+cola	AUT

Liste der 116 Gene, die in den Microarrayanalysen genauer untersucht wurden

Genname	Accession Nummer
Tas2r102	NM_199153
Tas2r105	NM_020501
Tas2r107	NM_199154
Tas2r108	NM_020502
Tas2r110	NM_199155
Tas2r118	NM_207022
Tas2r119	NM_020503
Tas2r130	NM_199156
Tas2r135	NM_199159
Tas2r136	NM_181276
Tas2r139	NM_181275
Tas2r140	NM_021562
Tas2r116	NM_053212
Tas2r103	NM_053211
Tas2r104	NM_207011
Tas2r109	NM_207017
Tas2r114	NM_207019
Tas2r120	NM_207023
Tas2r121	NM_207024
Tas2r122	NM_001039128
Tas2r123	NM_207025
Tas2r124	NM_207026
Tas2r125	NM_207027
Tas2r126	NM_207028
Tas2r129	NM_207029
Tas2r131	NM_207030
Tas2r134	NM_199158
Tas2r137	NM_001025385
Tas2r138	NM_001001451
Tas2r106	NM_207016
Tas2r113	NM_207018
Tas2r115	NM_207020
Tas2r117	NM_207021
Tas2r143	NM_001001452

Tas2r144	NM_001001453
Htr1a	NM_008308
Htr2c	NM_008312
Htr1b	NM_010482
Htr2a	NM_172812
Htr2b	NM_008311
Htr2b	NM_008311
Htr7	NM_008315
Htr7	NM_008315
Htr3a	NM_013561
Htr4	NM_008313
Htr6	NM_021358
Htr1d	NM_008309
Htr5b	NM_010483
Htr5a	NM_008314
Htr1f	NM_008310
Htr3b	NM_020274
Pde6b	NM_008806
Pde4d	NM_011056
Pde5a	NM_153422
Pde10a	NM_011866
Pde3b	NM_011055
Pde6g	NM_012065
Pde4b	NM_019840
Pde6a	NM_146086
Pde6c	NM_033614
Pde6c	NM_019798
Pde4a	NM_019798
Pde6a	NM_146086
Pde3a	NM_018779
Pde2a	NM_001008548
Pde1b	NM_008800
Pde7a	NM_008802
Adcy5	NM_001012765
Adcy1	NM_009622

Adcy3	NM_138305
Adcy6	NM_007405
Adcy8	NM_009623
Adcy8	NM_173029
Adcy10	NM_173029
Adcy9	NM_009624
Adcy9	NM_153534
Adcy2	NM_153534
Adcy7	NM_007406
Adcy4	NM_080435
T1R1	NM_031867
T1R2	NM_031873
T1R3	NM_031872
T2R1	NM_020503
CAR4	NM_007607
PLCB2	NM_177568
Gnat1	NM_008140
Gnat2	NM_008141
Gnat3	NM_001081143
TRPM5	NM_020277
TRPM8	NM_134252
TRPV1	NM_001001445
TRPV4	NM_022017

TRPA1	NM_177781
CASR	NM_013803
Ins2	NM_008387
Ins1	NM_008386
Insr	NM_010568
Adipor1	NM_028320
Adipor2	NM_197985
Lep	NM_008493
Lepr	NM_010704
Cd36	NM_007643
Pparg	NM_011146
Ppara	NM_011144
Ppard	NM_011145
Slc27a2	NM_011978
Slc27a4	NM_011989
Fabp2	NM_007980
ENaC	NM_011324
ENaC	NM_011324
Scnn1a	NM_011325
Scnn1b	NM_011326
Bdnf	NM_007540
Slc2a1	NM_011400
Slc2a4	NM_009204
SGLT1	NM_019810

Rohdaten der Microarryanalysen der Bitterrezeptoren

Genname	Accession Nummer	Genexpression							
		CTRL + Water	CTRL + Cola AT	CTRL + Cola SK	MC + Water	MC + Cola AT	MC + Cola SK		
Tas2r102	NM_199153	40,58	43,08	44,46	46,26	44,30	44,78		
Tas2r105	NM_020501	45,61	52,96	57,79	49,77	44,98	43,94		
Tas2r107	NM_199154	55,77	47,40	42,76	39,71	52,10	52,47		
Tas2r108	NM_020502	54,95	50,88	53,45	54,19	51,66	54,53		
Tas2r110	NM_199155	38,02	40,75	38,12	37,51	38,39	43,01		
Tas2r118	NM_207022	66,22	76,89	64,69	79,27	23,16	74,02		
Tas2r119	NM_020503	48,88	43,18	55,50	46,57	60,53	51,07		
Tas2r130	NM_199156	11,84	11,21	15,12	13,83	35,50	30,18		
Tas2r135	NM_199159	66,36	59,96	68,39	66,73	72,80	47,09		
Tas2r136	NM_181276	25,09	18,72	16,27	17,35	35,42	16,58		
Tas2r139	NM_181275	36,22	36,12	40,34	44,27	43,03	30,89		
Tas2r140	NM_021562	62,06	65,02	56,60	55,49	51,50	49,64		
Tas2r116	NM_053212	63,54	65,44	61,66	73,15	65,17	64,92		
Tas2r103	NM_053211	56,18	55,40	53,42	53,65	36,81	56,75		
Tas2r104	NM_207011	22,42	13,32	29,64	16,84	41,07	28,96		
Tas2r109	NM_207017	61,51	58,35	63,24	60,84	52,36	59,07		
Tas2r114	NM_207019	30,87	28,78	16,56	17,35	42,44	26,37		
Tas2r120	NM_207023	51,20	61,23	51,10	57,08	45,32	57,53		
Tas2r121	NM_207024	42,92	38,41	40,24	38,02	40,00	45,62		
Tas2r122	NM_001039128	59,29	71,81	56,79	69,95	59,67	61,47		
Tas2r123	NM_207025	31,68	42,45	39,80	40,97	35,42	27,91		
Tas2r124	NM_207026	41,44	37,85	21,10	30,30	67,50	58,23		
Tas2r125	NM_207027	44,27	38,99	33,00	38,53	41,66	35,65		
Tas2r126	NM_207028	54,42	52,56	57,84	55,14	49,99	53,55		
Tas2r129	NM_207029	42,80	40,66	51,38	45,82	46,40	39,34		
Tas2r131	NM_207030	62,96	60,39	67,09	62,14	50,44	55,38		
Tas2r134	NM_199158	65,23	72,22	61,02	59,41	57,89	62,96		
Tas2r137	NM_001025385	55,26	61,72	63,56	61,84	52,64	54,41		
Tas2r138	NM_001001451	41,65	34,42	22,50	26,76	39,30	31,10		
Tas2r106	NM_207016	17,21	16,33	14,27	19,51	41,96	33,08		
Tas2r113	NM_207018	50,10	45,58	44,32	47,40	43,71	43,78		
Tas2r115	NM_207020	46,27	39,31	39,15	35,37	56,63	45,95		
Tas2r117	NM_207021	34,85	34,42	34,90	35,00	38,96	32,86		
Tas2r143	NM_001001452	68,18	54,32	55,03	49,96	63,77	60,55		
Tas2r144	NM_001001453	60,08	66,35	61,40	68,48	53,12	54,18		

Rohdaten der Microarrayanalysen von in der Signaltransduktion ausgewählten Genen

Genexpression								
Genname	Accession Nummer	CTRL + Water	CTRL + Cola AT	CTRL + Cola SK	MC + Water	MC + Cola AT	MC + Cola SK	
Htr1a	NM_008308	50,40	58,79	51,43	54,88	49,40	49,80	
Htr2c	NM_008312	53,46	58,35	49,80	55,40	45,10	56,88	
Htr1b	NM_010482	53,13	50,96	50,89	47,48	51,59	42,97	
Htr2a	NM_172812	68,47	81,80	77,50	69,42	67,04	71,71	
Htr2b	NM_008311	64,75	60,28	53,06	59,61	50,60	54,81	
Htr2b	NM_008311	71,46	72,28	73,90	74,11	69,62	73,87	
Htr7	NM_008315	36,98	25,30	45,67	42,33	49,83	60,44	
Htr7	NM_008315	47,14	49,08	35,87	38,72	37,51	40,00	
Htr3a	NM_013561	43,58	36,71	42,28	43,28	47,94	37,86	
Htr4	NM_008313	73,61	69,00	89,60	77,00	91,28	95,18	
Htr6	NM_021358	85,89	110,78	108,30	96,46	85,75	64,66	
Htr1d	NM_008309	74,88	75,84	76,45	81,31	77,73	66,91	
Htr5b	NM_010483	54,93	65,15	56,41	58,10	52,92	53,55	
Htr5a	NM_008314	51,44	57,94	54,46	62,43	46,76	60,88	
Htr1f	NM_008310	63,02	55,96	53,13	45,09	40,83	28,77	
Htr3b	NM_020274	29,76	16,21	15,85	12,11	28,71	25,02	
Pde6b	NM_008806	26,12	13,17	11,55	12,75	34,38	15,15	
Pde4d	NM_011056	50,27	46,39	45,97	53,73	42,34	54,31	
Pde5a	NM_153422	64,93	53,34	54,08	57,50	59,73	60,44	
Pde10a	NM_011866	50,27	56,07	53,70	56,62	47,88	50,10	
Pde3b	NM_011055	59,26	50,86	52,55	53,20	53,36	57,32	
Pde6g	NM_012065	64,42	65,07	66,30	60,69	56,90	53,44	
Pde4b	NM_019840	48,33	44,97	39,96	42,98	52,46	43,93	
Pde6a	NM_146086	60,33	63,41	76,38	65,02	57,15	60,15	
Pde6c	NM_033614	71,24	58,98	49,83	58,86	66,72	64,90	
Pde6c	NM_019798	54,01	48,72	49,06	52,79	54,96	47,10	
Pde4a	NM_019798	57,50	66,62	59,38	61,42	56,41	58,68	
Pde6a	NM_146086	60,33	63,41	76,38	65,02	57,15	60,15	
Pde3a	NM_018779	36,16	34,18	29,19	36,01	56,24	46,95	
Pde2a	NM_001008548	82,72	93,25	78,35	77,46	89,23	82,66	
Pde1b	NM_008800	11,50	7,84	8,47	11,68	34,67	11,00	
Pde7a	NM_008802	58,42	61,84	62,47	70,56	54,37	57,52	

Rohdaten der Microarrayanalysen von in der Signaltransduktion ausgewählten Genen

Genname	Accession Nummer	Genexpression							
		CTRL + Water	CTRL + Cola AT	CTRL + Cola SK	MC + Water	MC + Cola AT	MC + Cola SK		
Adcy5	NM_001012765	40,41	32,25	31,45	25,63	55,38	42,30		
Adcy1	NM_009622	52,88	57,98	59,52	59,45	47,85	45,95		
Adcy3	NM_138305	106,23	114,66	85,06	89,95	83,23	69,25		
Adcy6	NM_007405	67,81	52,81	67,03	64,93	79,13	61,74		
Adcy8	NM_009623	55,50	57,10	51,79	46,17	57,68	49,08		
Adcy8	NM_173029	20,19	16,13	20,89	27,04	33,92	30,51		
Adcy10	NM_173029	63,94	73,48	77,78	72,93	61,00	65,20		
Adcy9	NM_009624	52,36	65,64	58,93	57,85	53,23	52,30		
Adcy9	NM_153534	19,85	14,76	18,58	17,08	38,08	14,79		
Adcy2	NM_153534	52,27	56,27	45,02	44,28	49,96	56,27		
Adcy7	NM_007406	41,26	44,26	41,89	51,86	38,49	39,93		
Adcy4	NM_080435	78,02	62,87	62,72	54,88	69,67	64,82		
TLR1	NM_031867	49,05	50,49	37,04	32,49	57,83	58,23		
TLR2	NM_031873	67,02	58,68	67,23	71,68	69,73	71,38		
TLR3	NM_031872	76,48	68,24	70,76	51,87	73,05	73,87		
TLR1	NM_020503	48,88	43,18	55,50	46,57	60,53	51,07		
CAR4	NM_007607	29,99	19,07	23,96	21,30	38,16	34,95		
PLCB2	NM_177568	69,26	63,76	54,86	67,82	58,14	59,12		
Gnat1	NM_008140	57,38	74,16	73,29	64,36	66,13	56,27		
Gnat2	NM_008141	50,46	35,85	33,98	36,94	41,31	35,99		
Gnat3	NM_001081143	46,74	44,99	40,94	50,63	44,03	52,43		
TRPM5	NM_020277	50,16	45,96	51,07	53,46	53,44	53,24		
TRPM8	NM_134252	82,72	70,44	75,33	79,42	84,29	80,44		
TRPV1	NM_001001445	46,34	34,20	56,72	45,87	55,94	33,00		
TRPV4	NM_022017	61,23	63,84	56,99	66,62	48,17	54,34		
TRPA1	NM_177781	47,81	51,67	49,39	48,75	48,86	53,40		

Rohdaten der Microarrayanalysen von im Stoffwechsel ausgewählten Genen

Genname	Accession Nummer	Genexpression							
		CTRL + Water	CTRL + Cola AT	CTRL + Cola SK	MC + Water	MC + Cola AT	MC + Cola SK		
CASR	NM_013803	46,79	52,84	49,86	53,78	48,70	40,44		
Ins2	NM_008387	64,05	59,15	59,52	57,34	28,23	55,83		
Ins1	NM_008386	54,90	53,37	40,64	44,84	54,37	53,40		
Insr	NM_010568	65,31	62,66	64,86	61,93	55,74	67,20		
Adipor1	NM_028320	71,32	63,92	70,66	46,25	80,70	49,97		
Adipor2	NM_197985	60,73	61,01	65,66	67,50	54,19	56,44		
Lep	NM_008493	76,72	74,69	68,07	73,55	76,99	72,48		
LepR	NM_010704	71,82	64,30	60,63	63,59	66,74	64,89		
Cd36	NM_007643	53,84	48,52	51,85	51,94	50,86	38,89		
Pparg	NM_011146	59,62	62,16	58,22	63,82	53,08	56,63		
Ppara	NM_011144	45,65	53,24	52,41	57,52	45,14	47,06		
Ppard	NM_011145	67,02	55,55	65,01	80,47	64,22	75,12		
Slc27a2	NM_011978	51,25	55,51	57,74	70,09	71,61	63,87		
Slc27a4	NM_011989	41,02	34,66	31,22	37,33	61,05	47,32		
Fabp2	NM_007980	59,27	59,96	45,56	44,74	57,55	54,02		
ENaC	NM_011324	67,77	62,38	66,96	73,38	66,31	68,43		
ENaC	NM_011324	159,10	160,16	132,90	142,08	177,42	162,65		
Schn1a	NM_011325	67,29	64,22	65,77	73,33	69,55	68,87		
Schn1b	NM_011326	54,53	52,06	46,50	39,94	56,97	48,86		
Bdnf	NM_007540	47,84	47,40	56,79	51,62	53,13	50,90		
GLUT1	NM_011400	52,10	40,66	38,37	39,98	38,96	38,75		
GLUT4	NM_009204	55,17	56,38	59,52	59,41	63,30	52,63		
SGLT1	NM_019810	34,28	29,13	26,76	32,43	42,81	31,65		

N0-Werte der Marker für Typ I-III Geschmackszellen nach dem Ausreißertest

ROUT (Q = 1 %)

ID	Gruppe	Slc1a3	Entpd2	T1R3	GNAT3	Snap25	Car4
19	CTRL + Cola AT	8,93E-03	1,28E-02	7,98E-03	2,37E-02	8,48E-03	6,99E-03
21	CTRL + Cola AT	6,43E-03	1,07E-02	2,67E-03	1,52E-02	3,69E-03	6,13E-03
22	CTRL + Cola AT	6,26E-03	1,22E-02	8,47E-03	2,28E-02	6,22E-03	4,57E-03
23	CTRL + Cola AT	1,66E-02	1,20E-02	1,66E-02	3,67E-02	1,04E-02	2,64E-03
95	CTRL + Cola AT	4,38E-03		2,11E-02	2,15E-02	1,00E-02	4,87E-03
96	CTRL + Cola AT	1,61E-02	1,10E-02	6,57E-03	1,02E-02	2,04E-03	1,00E-03
97	CTRL + Cola AT			1,87E-03	5,18E-02	2,81E-02	
2	CTRL + Cola SK						
3	CTRL + Cola SK	1,59E-02	1,67E-02	8,38E-03	1,72E-02	1,00E-02	1,37E-03
5	CTRL + Cola SK	7,39E-03	1,63E-02	7,38E-03	2,58E-02	7,13E-03	1,93E-03
7	CTRL + Cola SK	7,22E-03	3,51E-03				
8	CTRL + Cola SK	1,06E-02	2,77E-02	8,49E-03	1,74E-02	7,52E-03	5,60E-03
9	CTRL + Cola SK	7,39E-03	2,92E-02	1,89E-02	3,81E-02	8,66E-03	4,70E-03
12	CTRL + Cola SK	7,77E-03	3,10E-02	1,46E-02	5,85E-02	7,62E-03	7,23E-03
13	CTRL + Cola SK	1,41E-02	2,33E-02	1,27E-02	5,00E-02	8,13E-03	1,96E-02
15	CTRL + Cola SK	9,77E-03	1,25E-02	1,35E-02	3,59E-02	4,89E-03	1,03E-02
17	CTRL + Cola SK	1,55E-02	1,24E-02	1,46E-02	3,62E-02	6,99E-03	5,41E-03
18	CTRL + Cola SK	4,02E-03	1,27E-02	6,34E-03	2,21E-02	3,05E-03	8,00E-03
63	CTRL + Cola SK	4,55E-03	1,94E-02	4,78E-03	3,77E-02	7,82E-03	6,86E-03
26	CTRL + Wasser	1,76E-02	2,63E-02			2,61E-02	8,98E-03
27	CTRL + Wasser	5,39E-03	3,13E-02	1,92E-03	4,62E-04	3,79E-03	4,18E-03
28	CTRL + Wasser						
29	CTRL + Wasser	4,30E-03	4,84E-03	2,89E-03	4,81E-03	8,58E-04	9,23E-04
30	CTRL + Wasser	1,33E-02	1,16E-02	4,61E-03	1,15E-02	4,05E-03	4,37E-03
31	CTRL + Wasser	3,32E-03	9,11E-03	6,33E-03	1,22E-02	2,96E-03	1,61E-03
54	CTRL + Wasser	8,77E-03	1,66E-02	2,49E-02	1,01E-01	1,05E-02	3,03E-03
58	CTRL + Wasser	9,61E-03	1,28E-02	7,27E-03	2,02E-02	5,99E-03	3,42E-03
71	CTRL + Wasser	8,80E-03	1,96E-02	5,99E-03	2,71E-02	1,30E-02	2,79E-03
92	CTRL + Wasser	2,43E-03	1,56E-02	1,68E-02	6,34E-02	6,77E-03	5,52E-03
94	CTRL + Wasser	3,77E-03	2,07E-02	3,82E-03	1,23E-02	5,13E-03	1,07E-02

N0-Werte der Marker für Typ I-III Geschmackszellen nach dem Ausreißertest

ROUT (Q = 1 %)

ID	Gruppe	Slc1a3	Entpd2	T1R3	GNAT3	Snap25	Car4
61	MCD + Cola AT	9,83E-03	2,27E-02	1,25E-03	9,74E-04	9,39E-04	4,88E-03
65	MCD + Cola AT	1,12E-02	2,04E-02	1,29E-02	6,12E-02	1,08E-02	5,00E-03
66	MCD + Cola AT	1,70E-02	2,27E-02	1,60E-02	5,99E-02	7,63E-03	3,11E-03
79	MCD + Cola AT	9,43E-03	2,16E-02	1,08E-02	3,63E-02	9,06E-03	5,27E-03
80	MCD + Cola AT	1,77E-02	2,42E-02	9,20E-03	2,24E-02	6,22E-03	9,18E-03
81	MCD + Cola AT	1,12E-02	1,64E-02	8,59E-03	3,40E-02	1,08E-02	6,46E-03
83	MCD + Cola AT	8,96E-03	2,33E-02	1,33E-02	3,72E-02	1,18E-02	1,18E-02
68	MCD + Cola SK	1,11E-02	1,55E-02	9,07E-03	2,60E-02	1,12E-02	3,06E-03
72	MCD + Cola SK	9,82E-03	2,04E-02	1,84E-02	5,59E-02	9,74E-03	6,52E-03
73	MCD + Cola SK	9,07E-03	3,08E-02	1,96E-02	5,11E-02	1,15E-02	4,23E-03
75	MCD + Cola SK	6,53E-03	3,15E-02	1,11E-02	3,85E-02	1,14E-02	9,81E-03
76	MCD + Cola SK	7,62E-03	1,46E-02	9,58E-03	3,04E-02	1,00E-02	1,10E-02
77	MCD + Cola SK	1,31E-02	6,73E-03	5,62E-03	4,34E-02		6,10E-03
84	MCD + Cola SK	9,44E-03	1,64E-02	5,51E-03	1,93E-02	4,82E-03	8,06E-03
36	MCD + Wasser	1,13E-02	1,36E-02	1,30E-02	3,13E-02	7,44E-03	4,17E-03
37	MCD + Wasser	2,41E-02	2,41E-02	1,25E-02	1,24E-02	1,47E-02	8,25E-03
43	MCD + Wasser	1,05E-03	5,27E-03	4,43E-03	1,35E-02	3,60E-03	2,26E-03
44	MCD + Wasser	1,36E-02	8,72E-03	2,20E-04	4,03E-03	2,51E-03	2,88E-03
49	MCD + Wasser	6,59E-03	3,18E-02	1,69E-02	5,58E-02	2,10E-02	1,29E-02
60	MCD + Wasser	8,13E-03	2,50E-02	1,72E-02	3,54E-02	1,15E-02	3,86E-03
85	MCD + Wasser	6,84E-03	1,39E-02	1,16E-02	3,09E-02	8,92E-03	1,71E-03
102	MCD + Wasser	1,09E-02	1,98E-02	8,39E-03	2,88E-02	1,24E-02	7,98E-03

*N0-Werte der Marker für Basalzellen, Stammzellen und alle
Geschmackszelltypen nach dem Ausreißertest ROUT (Q = 1 %)*

ID	Gruppe	Sox2	Ki67	Shh	Hes6	KCNQ1	Krt8
19	CTRL + Cola AT	5,79E-03	1,80E-02	6,71E-04	2,14E-03	1,50E-02	9,20E-02
21	CTRL + Cola AT	6,19E-03	1,06E-02	1,33E-03	2,11E-03	2,16E-02	6,69E-02
22	CTRL + Cola AT	8,91E-03	1,33E-02	2,70E-03	1,92E-03	1,52E-02	5,87E-02
23	CTRL + Cola AT	1,22E-02	2,86E-02	3,19E-03	2,45E-03	1,48E-02	4,80E-02
95	CTRL + Cola AT	1,19E-02	4,64E-02	6,67E-03	6,99E-04	1,16E-02	5,02E-02
96	CTRL + Cola AT	6,53E-03	1,69E-02	3,22E-03	3,06E-03	6,82E-03	8,22E-03
97	CTRL + Cola AT	2,07E-02	7,55E-02			4,98E-02	7,46E-02
2	CTRL + Cola SK						
3	CTRL + Cola SK	1,20E-02	2,62E-02	4,12E-03	5,03E-03	1,95E-02	5,75E-02
5	CTRL + Cola SK	8,16E-03	2,17E-02	4,97E-03	2,50E-03	2,42E-02	6,16E-02
7	CTRL + Cola SK	2,94E-03		1,26E-03	2,61E-03	1,16E-02	3,56E-03
8	CTRL + Cola SK	7,53E-03	2,30E-02	1,40E-03	6,03E-03	1,10E-02	8,29E-02
9	CTRL + Cola SK	1,04E-02	2,57E-02	1,78E-03	4,49E-03	2,09E-02	1,10E-01
12	CTRL + Cola SK	7,45E-03	2,71E-02	2,38E-03	6,98E-03	2,13E-02	1,29E-01
13	CTRL + Cola SK	1,28E-02	2,03E-02	4,89E-03	2,83E-03	2,36E-02	7,98E-02
15	CTRL + Cola SK	1,16E-02	2,70E-02	3,42E-03	2,95E-03	1,91E-02	4,74E-02
17	CTRL + Cola SK	1,40E-02	2,52E-02		2,84E-03	2,01E-02	5,05E-02
18	CTRL + Cola SK	8,15E-03	1,79E-02	2,20E-03	3,09E-03	1,62E-02	7,85E-02
63	CTRL + Cola SK	8,78E-03	2,26E-02	1,42E-03	2,45E-03	1,33E-02	1,08E-01
26	CTRL + Wasser	2,14E-02	4,56E-02	6,24E-03	5,94E-03	3,57E-02	1,68E-01
27	CTRL + Wasser	1,26E-02	9,16E-03		5,02E-03	7,10E-03	1,98E-01
28	CTRL + Wasser						
29	CTRL + Wasser	8,86E-03	3,54E-03	1,20E-03	8,09E-04	2,60E-03	6,16E-03
30	CTRL + Wasser	9,53E-03	1,13E-02	2,77E-03	2,89E-03	1,43E-02	6,38E-02
31	CTRL + Wasser	8,88E-03	2,48E-02	2,58E-03	1,97E-03	1,10E-02	3,48E-02
54	CTRL + Wasser	1,52E-02	3,24E-02	8,19E-03	4,99E-03	2,35E-02	8,65E-02
58	CTRL + Wasser	7,69E-03	1,19E-02	2,32E-03	1,58E-03	1,12E-02	5,13E-02
71	CTRL + Wasser	5,38E-03	2,04E-02	3,57E-03	9,72E-04	2,54E-02	7,25E-02
92	CTRL + Wasser	1,33E-02	9,36E-03	2,74E-03	2,24E-03	1,58E-02	8,00E-02
94	CTRL + Wasser	6,78E-03	6,95E-03	2,16E-03	8,83E-04	2,10E-02	1,34E-01

*N0-Werte der Marker für Basalzellen, Stammzellen und alle
Geschmackszelltypen nach dem Ausreißertest ROUT (Q = 1 %)*

ID	Gruppe	Sox2	Ki67	Shh	Hes6	KCNQ1	Krt8
61	MCD + Cola AT	9,84E-03	6,66E-03	1,13E-03	2,44E-03	9,21E-03	8,09E-02
65	MCD + Cola AT	7,60E-03	1,63E-02	1,19E-03	1,49E-03	1,29E-02	1,15E-01
66	MCD + Cola AT	9,98E-03	1,64E-02	1,64E-03	1,88E-03	1,51E-02	8,05E-02
79	MCD + Cola AT	8,16E-03	2,37E-02	1,20E-03	3,80E-03	1,66E-02	1,05E-01
80	MCD + Cola AT	1,20E-02	3,04E-02		8,92E-03	3,24E-02	1,27E-01
81	MCD + Cola AT	7,51E-03	2,03E-02	1,29E-03	3,98E-03	1,42E-02	7,93E-02
83	MCD + Cola AT	7,40E-03	1,76E-02	9,69E-04	4,12E-03	1,74E-02	8,19E-02
68	MCD + Cola SK	1,01E-02	1,34E-02	5,72E-03	4,00E-03	1,11E-02	4,77E-02
72	MCD + Cola SK	1,03E-02	7,99E-03	4,46E-03	3,58E-03	1,85E-02	5,56E-02
73	MCD + Cola SK	8,75E-03	6,56E-03	1,21E-03	4,56E-03	1,59E-02	1,57E-01
75	MCD + Cola SK	1,03E-02	1,12E-02	7,45E-03	4,34E-03	2,24E-02	9,36E-02
76	MCD + Cola SK	1,03E-02		8,91E-03	3,27E-03	1,68E-02	4,29E-02
77	MCD + Cola SK	8,53E-03	9,04E-03	9,69E-03	8,12E-03	2,47E-02	7,69E-02
84	MCD + Cola SK	5,98E-03	1,64E-02	7,48E-04	2,94E-03	6,72E-03	3,88E-02
36	MCD + Wasser	8,64E-03	1,58E-02	1,99E-03	2,13E-03	1,40E-02	7,82E-02
37	MCD + Wasser	1,37E-02	1,68E-02		5,36E-03	3,42E-02	4,23E-02
43	MCD + Wasser	5,03E-03	4,15E-03	2,04E-03	8,83E-04	7,81E-03	2,16E-02
44	MCD + Wasser	8,41E-03	2,71E-02	5,76E-03	1,61E-03	8,10E-03	1,41E-02
49	MCD + Wasser	8,03E-03	2,24E-02	1,35E-03	2,14E-03	2,88E-02	1,28E-01
60	MCD + Wasser	8,53E-03	1,46E-02	1,63E-03	2,05E-03	1,28E-02	7,07E-02
85	MCD + Wasser	1,05E-02	1,81E-02	1,57E-03	3,00E-03	1,29E-02	6,45E-02
102	MCD + Wasser	8,25E-03	1,65E-02	2,98E-03	2,16E-03	2,97E-02	1,50E-01

N0-Werte der Bitterrezeptoren nach dem Ausreißertest ROUT (Q = 1 %)

ID	Gruppe	<i>Tas2r106</i>	<i>Tas2r104</i>	<i>Tas2r118</i>	<i>Tas2r124</i>	<i>Tas2r130</i>
19	CTRL + Cola AT	1,87E-03	1,96E-03	4,82E-03	6,37E-04	6,70E-04
21	CTRL + Cola AT	3,17E-03	4,99E-03	4,07E-03	4,81E-04	4,57E-04
22	CTRL + Cola AT	3,31E-03	4,85E-03	6,72E-03	1,18E-03	1,23E-03
23	CTRL + Cola AT	2,06E-03	5,97E-03	9,32E-03	2,95E-03	2,38E-03
95	CTRL + Cola AT	1,01E-02	1,37E-02	2,27E-02	4,17E-03	3,92E-03
96	CTRL + Cola AT	2,59E-03	5,25E-03	8,57E-03	5,78E-03	6,42E-03
97	CTRL + Cola AT					
2	CTRL + Cola SK					
3	CTRL + Cola SK	8,16E-03	1,42E-02	1,57E-02	1,51E-03	2,36E-03
5	CTRL + Cola SK	4,51E-03	9,92E-03	1,43E-02	2,90E-03	2,39E-03
7	CTRL + Cola SK		1,23E-02	1,26E-02		
8	CTRL + Cola SK	1,37E-03	1,73E-03	3,55E-03	6,88E-04	9,05E-04
9	CTRL + Cola SK	3,97E-03	6,21E-03	9,85E-03	1,75E-03	2,63E-03
12	CTRL + Cola SK	3,50E-03	3,61E-03	7,33E-03	1,64E-03	1,87E-03
13	CTRL + Cola SK	6,87E-03	1,74E-02	2,57E-02	3,70E-03	4,18E-03
15	CTRL + Cola SK	8,25E-03	1,68E-02	2,23E-02	2,24E-03	3,93E-03
17	CTRL + Cola SK	1,47E-02	2,52E-02	4,04E-02		
18	CTRL + Cola SK	8,08E-03	2,13E-02	2,19E-02	3,16E-03	6,24E-03
63	CTRL + Cola SK	2,43E-03	3,82E-03	5,97E-03	1,23E-03	2,02E-03
26	CTRL + Wasser	9,90E-03	1,67E-02	2,98E-02	3,23E-03	5,04E-03
27	CTRL + Wasser			1,99E-04		
28	CTRL + Wasser					
29	CTRL + Wasser	2,05E-04	2,86E-04	7,44E-04	4,81E-04	
30	CTRL + Wasser	3,28E-03	7,75E-03	1,22E-02	1,11E-03	1,05E-03
31	CTRL + Wasser	3,42E-03	8,05E-03	1,08E-02	3,73E-03	3,59E-03
54	CTRL + Wasser	4,89E-03	1,01E-02	1,68E-02	4,37E-03	6,70E-03
58	CTRL + Wasser	2,31E-03	4,25E-03	5,69E-03	9,75E-04	8,42E-04
71	CTRL + Wasser	3,83E-03	6,66E-03	1,23E-02	3,40E-03	2,88E-03
92	CTRL + Wasser	3,53E-03	7,60E-03	1,00E-02	1,91E-03	3,21E-03
94	CTRL + Wasser	2,24E-03	4,15E-03	6,90E-03	1,02E-03	8,91E-04

N0-Werte der Bitterrezeptoren nach dem Ausreißertest ROUT (Q = 1 %)

ID	Gruppe	<i>Tas2r106</i>	<i>Tas2r104</i>	<i>Tas2r118</i>	<i>Tas2r124</i>	<i>Tas2r130</i>
61	MCD + Cola AT	5,28E-04	3,60E-04	5,28E-04	1,30E-03	1,00E-03
65	MCD + Cola AT	2,13E-03	2,47E-03	5,92E-03	4,13E-04	8,96E-04
66	MCD + Cola AT	3,65E-03	3,62E-03	8,26E-03	7,26E-04	1,37E-03
79	MCD + Cola AT	2,38E-03	3,61E-03	6,48E-03	4,33E-04	6,03E-04
80	MCD + Cola AT	7,02E-03		1,47E-02		
81	MCD + Cola AT	1,77E-03	3,05E-03	5,25E-03	9,11E-04	8,28E-04
83	MCD + Cola AT	2,52E-03	3,83E-03	6,72E-03	7,44E-04	6,45E-04
68	MCD + Cola SK	6,00E-03	1,33E-02	2,08E-02	3,59E-03	4,43E-03
72	MCD + Cola SK	5,99E-03	8,19E-03	1,46E-02	2,05E-03	4,19E-03
73	MCD + Cola SK	1,97E-03	3,06E-03	5,67E-03	6,95E-04	1,26E-03
75	MCD + Cola SK	9,72E-03	1,85E-02	2,70E-02	4,09E-03	5,71E-03
76	MCD + Cola SK	1,22E-02	2,43E-02	2,58E-02	7,48E-03	1,09E-02
77	MCD + Cola SK	7,28E-03	9,90E-03	2,12E-02	1,07E-02	1,35E-02
84	MCD + Cola SK	1,97E-03	3,69E-03	8,27E-03	2,70E-04	1,89E-03
36	MCD + Wasser	3,33E-03	4,43E-03	7,70E-03	1,04E-03	8,90E-04
37	MCD + Wasser					
43	MCD + Wasser		1,82E-02	1,80E-02	2,82E-03	3,37E-03
44	MCD + Wasser	5,52E-03	8,58E-03	9,10E-03	6,27E-03	3,63E-03
49	MCD + Wasser	3,90E-03	3,54E-03	7,24E-03	8,62E-04	1,65E-03
60	MCD + Wasser	3,35E-03	6,80E-03	9,57E-03	8,63E-04	1,19E-03
85	MCD + Wasser	3,48E-03	3,44E-03	5,97E-03	6,42E-04	5,68E-04
102	MCD + Wasser	4,14E-03	5,64E-03	8,36E-03	1,90E-03	2,94E-03

*N0-Werte der Gene 5-HTR3b, Slc2a1, PDE6b, T1R2 nach dem Ausreißertest
ROUT (Q = 1 %)*

ID	Gruppe	5HTR3b	Slc2a1	PDE6b	T1R2
19	CTRL + Cola AT	1,61E-04	4,97E-02	9,79E-05	3,25E-03
21	CTRL + Cola AT	2,18E-04	3,53E-02		1,48E-03
22	CTRL + Cola AT	1,59E-04	2,12E-02	3,46E-04	2,46E-03
23	CTRL + Cola AT	2,89E-04	3,65E-02	1,03E-03	3,41E-03
95	CTRL + Cola AT		6,95E-02		
96	CTRL + Cola AT		3,37E-02	2,63E-03	2,46E-03
97	CTRL + Cola AT		2,57E-02		
2	CTRL + Cola SK				
3	CTRL + Cola SK		3,47E-02	4,70E-04	4,51E-03
5	CTRL + Cola SK		2,64E-02	1,16E-03	2,57E-03
7	CTRL + Cola SK		3,74E-02		1,23E-02
8	CTRL + Cola SK	3,35E-04	3,37E-02	3,39E-04	1,24E-03
9	CTRL + Cola SK	1,13E-04	3,09E-02	4,95E-04	4,67E-03
12	CTRL + Cola SK	1,39E-04	2,77E-02	9,16E-04	3,24E-03
13	CTRL + Cola SK		2,63E-02	2,49E-03	5,41E-03
15	CTRL + Cola SK		3,04E-02		6,23E-03
17	CTRL + Cola SK		3,43E-02	3,64E-03	5,00E-03
18	CTRL + Cola SK		1,71E-02	2,01E-03	4,66E-03
63	CTRL + Cola SK	5,02E-04	3,98E-02	4,91E-04	1,69E-03
26	CTRL + Wasser		4,37E-02	6,62E-04	9,04E-03
27	CTRL + Wasser	1,04E-03	3,40E-02		
28	CTRL + Wasser				
29	CTRL + Wasser		3,33E-02		5,18E-04
30	CTRL + Wasser		2,50E-02	6,47E-04	1,63E-03
31	CTRL + Wasser		2,71E-02	1,36E-03	2,20E-03
54	CTRL + Wasser	5,80E-04	4,05E-02	3,75E-03	6,57E-03
58	CTRL + Wasser	5,58E-05	2,88E-02	5,43E-04	2,96E-03
71	CTRL + Wasser	4,62E-04	3,04E-02	1,80E-03	2,20E-03
92	CTRL + Wasser	3,00E-04	2,46E-02		5,68E-03
94	CTRL + Wasser	1,45E-04	1,66E-02	6,64E-04	1,26E-03

N0-Werte der Gene 5-HTR3b, Slc2a1, PDE6b, T1R2 nach dem Ausreißertest

ROUT (Q = 1 %)

ID	Gruppe	5HTR3b	Slc2a1	PDE6b	T1R2
61	MCD + Cola AT	1,89E-04	2,60E-02	1,47E-03	
65	MCD + Cola AT	1,13E-04	3,20E-02	1,63E-04	2,50E-03
66	MCD + Cola AT	3,26E-04	2,50E-02	1,56E-04	2,96E-03
79	MCD + Cola AT	3,37E-04	2,22E-02		2,08E-03
80	MCD + Cola AT	3,26E-04	1,86E-02	3,40E-03	2,39E-03
81	MCD + Cola AT	2,60E-04	2,56E-02	2,51E-04	2,66E-03
83	MCD + Cola AT	2,68E-04	2,08E-02	1,51E-04	2,72E-03
68	MCD + Cola SK		3,16E-02	9,81E-04	4,48E-03
72	MCD + Cola SK		3,20E-02	1,08E-03	4,65E-03
73	MCD + Cola SK	5,22E-05	2,80E-02	2,32E-04	5,37E-03
75	MCD + Cola SK	1,17E-03	3,04E-02	8,45E-04	5,21E-03
76	MCD + Cola SK		2,96E-02	7,15E-03	8,28E-03
77	MCD + Cola SK		2,88E-02	8,81E-03	2,53E-03
84	MCD + Cola SK		3,11E-02		2,65E-03
36	MCD + Wasser	1,61E-04	2,86E-02	3,44E-04	2,60E-03
37	MCD + Wasser		2,36E-02		2,32E-03
43	MCD + Wasser		1,56E-02	4,26E-04	5,30E-03
44	MCD + Wasser		1,87E-02	9,50E-04	
49	MCD + Wasser	2,95E-04	2,53E-02	2,94E-04	2,97E-03
60	MCD + Wasser		3,45E-02	2,43E-04	3,35E-03
85	MCD + Wasser	3,34E-04	2,58E-02	1,36E-04	3,41E-03
102	MCD + Wasser	5,46E-04	1,49E-02	1,53E-03	2,21E-03