

Abschlußbericht an das

Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Technologie

53170 Bonn

Forschungsvorhaben: 0311430 / 0

Verbundprojekt: Naturstoffe als neue funktionelle Salz- und Süßstoffe
zur Gesundheitsprophylaxe

Zahlungsempfänger: UNION Deutsche Lebensmittelwerke

Projektleiter: Dr. K. Ragotzky

Förderzeitraum: 1.1.1998 - 30.12.2000

Adresse: Postfach 10 15 09, 20010 Hamburg

INHALTSVERZEICHNIS

KURZE VORHABENS DARSTELLUNG	5
I. AUFGABENSTELLUNG	5
II. VORAUSSETZUNGEN.....	5
<i>Vorstudien zum Süßrezeptor:.....</i>	5
<i>Expertise:.....</i>	6
<i>Vorstudien zum humanen epithelialen Na⁺-Kanal (hENaC):.....</i>	6
<i>Expertise:.....</i>	6
III. PLANUNG UND ABLAUF DES VORHABENS.....	7
<i>Humaner epithelialer Na⁺-Kanal (hENaC).....</i>	7
<i>Süßrezeptor.....</i>	8
Ursprüngliche Planung.....	8
Angepaßte Planung (1.11.1999).....	8
IV. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER STAND ZU PROJEKTBEGINN.....	9
<i>Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Substanzen, die eine Erhöhung der Leitfähigkeit des humanen epithelialen Na⁺-Kanals (hENaC) induzieren.....</i>	9
<i>Klonierung des Rezeptors für das Süßprotein Thaumatin und Anwendung für die Suche nach funktionellen Liganden.....</i>	10
V. ZUSAMMENARBEIT MIT ANDEREN STELLEN	10
 ERGEBNISBERICHT	 11
I. ERZIELTES ERGEBNIS	11
I.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na ⁺ -KANALS (hENaC) INDUZIEREN	11
I.I.I..... <i>Entwicklung des zellulären Testsystems zur Aktivitätsbestimmung von Na⁺-Kanälen für hohen Probendurchsatz.....</i>	11
I.I.II. <i>Verwendung des Tests zur Messung der hENaC-Aktivität.....</i>	12
I.I.III. <i>Durchmusterung einer Tripeptidbank mit dem hENaC-Aktivitätstest.....</i>	13
I.I.IV. <i>Optimierungsansätze zur Stabilisierung der hENaC-Expression.....</i>	14
I.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	17
I.II.I..... <i>Universität Stuttgart-Hohenheim: Expressionsklonierung eines Thaumatinrezeptorgens.....</i>	17
I.II.I.I. Construction of the cDNA library.....	17
I.II.I.II. Expression screening.....	17
I.II.I.III. Screening results	19
I.II.I.IV. Conclusions	21
I.II.II. <i>JERINI Biotoools: Konstruktion eines Hefestammes zur Identifizierung und Klonierung des Süß-Rezeptors von Geschmackssinneszellen</i>	22
I.II.II.I. Zielsetzung dieses Teilvorhabens	22
I.II.II.II. Der Lebenszyklus von Hefe	22
I.II.II.III. Der Pheromonsignalweg von Hefe	23
I.II.II.IV...Herstellung eines gentechnisch veränderten Hefestammes zur Visualisierung der Kopplung eines GPCRs an den PRP	24
I.II.II.V. Erhöhung der Sensitivität des PRPs der Reporterhefe.....	27
I.II.II.VI..... Heterologe Expression und funktionale Kopplung eines Modell-GPCRs an den PRP der Reporterhefe.....	29
I.II.II.VII. Chimäre G-Proteine und die funktionale Kopplung weiterer GPCRs an den PRP einer Reporterhefe.....	31
I.II.II.VIII. Zusammenfassung.....	34

<i>I.II.III.LION Biosciences, University Stuttgart-Hohenheim and Unilever: Identification of taste receptor genes.....</i>	<i>35</i>
I.II.III.I. .. Generation of cDNA-libraries and enrichment of taste-specific cDNA-fragments by subtractive PCR followed by spotting of differential cDNAs on filter array	35
I.II.III.II. Elimination of redundant genes on filter array by repetitive hybridisation	36
I.II.III.III. Sequencing and primary sequence analysis of remaining clones.....	37
I.II.III.IV. Homology searches by BLAST	39
I.II.III.V. Result of data analysis	40
I.II.III.VI.Development of analysis strategy for the 1.962 cDNA sequences identified as unknown from rat taste bud tissue.....	42
I.II.III.VII. ... Status report of bioinformatical analysis of 4096 cDNAs from taste bud tissue and sequenced by LION (Status Feb. 2001).....	48
I.II.III.VIII. Verlauf der weiteren bioinformatischen Analyse der cDNA-Klone	49
II. VORAUSSICHTLICHER NUTZEN (VERWERTBARHEIT)	58
II.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na^+ -KANALS (hENAC) INDUZIEREN	58
II.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	58
III. FORTSCHRITT AUSSERHALB DES PROJEKTES	59
III.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na^+ -KANALS (hENAC) INDUZIEREN	59
III.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	59
IV. VERÖFFENTLICHUNGEN	60
IV.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na^+ -KANALS (hENAC) INDUZIEREN	60
IV.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN.....	60
V. LITERATUR:.....	61

ANLAGE I: ERFOLGSKONTROLLBERICHT .. FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

- I. BEITRAG AN FÖRDERPOLITISCHEN ZIELEN DES PROGRAMMS..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**
- II. WISSENSCHAFTLICHER UND TECHNISCHER ERFOLG DES VORHABENS, NEBENERGEBNISSE,
GESAMMELTE WESENTLICHE ERFAHRUNGEN
- II.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE
 ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na^+ -KANALS (hENAC)
 INDUZIEREN
- II.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR
 DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN
- III. EINHALTUNG DES KOSTEN- UND ZEITPLANS
- III.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE
 ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na^+ -KANALS (hENAC)
 INDUZIEREN
- III.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR
 DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN

IV. VERWERTUNG DER ERGEBNISSE INKL. VERWERTUNGSMÖGLICHKEITEN **FEHLER!
TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

IV.I. ENTWICKLUNG EINES TESTSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON SUBSTANZEN, DIE EINE
ERHÖHUNG DER LEITFÄHIGKEIT DES HUMANEN EPITHELIALEN Na^+ -KANALS (hENAC)
INDUZIEREN **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

IV.II. KLONIERUNG DES REZEPTORS FÜR DAS SÜßPROTEIN THAUMATIN UND ANWENDUNG FÜR
DIE SUCHE NACH FUNKTIONELLEN LIGANDEN **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

V. ERFINDUNGEN ETC..... **FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.**

VI. ARBEITEN DIE ZU KEINER LÖSUNG GEFÜHRT HABEN **FEHLER! TEXTMARKE NICHT
DEFINIERT.**

ANLAGE II: BERICHTSBLATT MIT KURZFASSUNG..... 66

-

Kurze Vorhabensdarstellung

I. Aufgabenstellung

Im Rahmen des geplanten Projekts sollte versucht werden, mit modernen biotechnologischen Ansätzen eine Methodik zur Suche nach neuen funktionellen Geschmacksubstanzen für die sensorischen Geschmacksqualitäten ‚Süß‘ und ‚Salzig‘ zu entwickeln. Dieses sollte durch biomolekulares "Screening" nach Geschmacksrezeptorliganden für einen Süßstoff-Rezeptor und für einen der Ionenkanäle, die den Salzgeschmack vermitteln, erfolgen. Die molekulare Identifizierung und Charakterisierung dieser beiden Zielproteine ist im Hinblick auf die Entwicklung von spezifischen Aktivatoren und Modulatoren besonders interessant; bei ausreichender Spezifität können entsprechende Substanzen die Sinnesmodalitäten „süß“ oder „salzig“ auslösen. Sie können daher unter Umständen auch für die Produktion von gesünderen Lebensmitteln verwendbar sein. Peptide, produziert aus natürlichen Eiweißen, sind dafür die geeigneten Kandidaten, da sie neben der Verdaubarkeit auch genügend Strukturdiversität aufweisen, um Rezeptorspezifische Interaktionen eingehen zu können.

II. Voraussetzungen

Es wurde vom bisherigen Stand der Forschung wird davon ausgegangen, daß die Wahrnehmung der verschiedenen Geschmacksqualitäten durch zumindest zwei unterschiedliche Klassen von Membranproteinen in den Sinneszellen eingeleitet wird (G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Ionenkanäle), wobei der noch unidentifizierte Rezeptor für Süßstoffe vermutlich zur ersten Klasse gehört, während einer der Ionenkanäle, die den Salzgeschmack vermitteln, dementsprechend in die zweite Klasse eingeteilt werden kann. Es wurde hiermit daher jeweils ein Modellprotein dieser zwei Proteinklassen mit biotechnologischen Ansätzen analysiert. Die verschiedenen Teilaspekte dieses Antrags wurden dabei von 3 renommierten Forschungsgruppen zusammen mit der Union Deutsche Lebensmittelwerke (UDL) bearbeitet.

Vorstudien zum Süßrezeptor::

Institut für Physiologie der Universität Hohenheim:

Optimierung von mRNA-Isolierungsprozeduren für gustatorisches Zungengewebe;

UDL, vertreten durch URL Vlaardingen:

Isolierung und Aufreinigung von Thaumatin I in Grammengen; Entwicklung eines Versuchsprotokolls zur radioaktiven Markierung von geschmacksaktivem Thaumatin.

LION Biosciences AG (Im Auftrag von Unilever):

Isolierung und bioinformatische Analyse von differentiell exprimierten Genen aus Geschmacksknospen mit Hilfe von Subtraktions-PCR.