

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND

MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

BIOTEHNOLOOGIA ÕPPETOOL

Mõru maitse tundlikkusega seotud polümorfismid TAS2R38 geenis

Bakalaureusetöö

12 EAP

Agneta Uusküla

Juhendajad

PhD Tõnis Org

PhD Ants Kurg

TARTU 2024

„Mõru maitse tundlikkusega seotud polümorfismid TAS2R38 geenis“

Mõrudus on üks viiest põhimaitsest, mida inimesed tunnevad ning seda reguleerib TAS2R38 geen. Käesoleva bakalaureusetöö põhieesmärk on välja töötada süljest eraldatava genoomse DNA põhine protokoll mõru maitse tundlikkusega seotud kolme üksiknukleotiidsel polümorfismi (SNP) (rs713598, rs1726866 ja rs10246939) tuvastamiseks inimese TAS2R38 geenis, mille põhjal on võimalik näitlikustada seoseid fenotüübiliste tunnuste ja DNA-s esinevate variatsioonide ehk genotüübi vahel, kombineerides polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR) Sangeri sekveneerimisega. Lisaks on töö eesmärk saada hinnang kolme mõru maitse tundlikkusega seotud SNP-i alleelisageduste, genotüüpide ja maitsetundlikkuse fenotüübiliste seoste kohta 20 vabatahtlikust indiviidist koosnevas valimis. Selleks koguti uuringusse kaasatud vabatahtlikelt täiskasvanud inimestelt informatsiooni nende mõru maitse tundlikkuse kohta ning määrati süljest eraldatud genoomse DNA põhjal maitsetundlikkusega seotud genotüüp vastava SNP-i asukohas.

Märksõnad: PTC, PROP, mõru maitse, TAS2R38 geen, SNP

CERCS kood: B220 Geneetika, tsütogeneetika

“Polymorphisms associated with bitter taste sensitivity in the TAS2R38 gene”

Bitterness, which is regulated by TAS2R38 gene, is one of the five basic tastes perceived by humans. The main goal of this thesis is to develop a protocol based on genomic DNA isolated from saliva for the detection of three single nucleotide polymorphisms (SNP) (rs713598, rs1726866 and rs10246939) in the human TAS2R38 gene related to bitter taste sensitivity. Combining polymerase chain reaction (PCR) with Sanger sequencing it is possible to demonstrate the relationship between phenotypic traits regarding bitter taste and DNA variations, i.e. genotype. In addition, the aim of the work is to obtain an estimate of the allele frequencies, genotypes and phenotypic associations of three bitter taste sensitivity-related SNPs among 20 volunteers. For this purpose, information about their bitter taste sensitivity was collected from volunteers involved in the study, and the genotype related to taste sensitivity was determined based on the DNA isolated from the saliva at the location of the corresponding SNP.

Keywords: PTC, PROP, bitter taste, TAS2R38 gene, SNP

CERCS code: B220 Genetics, cytogenetics

SISUKORD

SISUKORD	3
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1. Maitseretseptorid	6
1.2. TAS2R geeniperekond	7
1.3. TAS2R38 geen	8
1.3.1. TAS2R38 geeni SNP-e käsitlevate uuringute võrdlus	10
2. EKSPERIMENTAALOSA	12
2.1. Töö eesmärgid	12
2.2. Materjal ja meetodika.....	12
2.2.1. Maitsetundlikkuse testimine	12
2.2.2. DNA eraldamine ja kontsentratsiooni mõõtmine	13
2.2.3. Praimerite disain	14
2.2.4. PCR.....	16
2.2.5. Sangeri sekveneerimine	17
2.3. Tulemused ja arutelu	17
2.3.1. Praimerite testimine ja valimine	17
2.3.2. Sangeri sekveneerimise tulemused	19
KOKKUVÕTE	27
SUMMARY	28
TÄNUSÕNAD	30
KIRJANDUSE LOETELU.....	31
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....	34
LIHTLITSENTS.....	35

KASUTATUD LÜHENDID

A –alaniin (ingl *alanine*)

bp –aluspaar (ingl *base pair*)

dNTP –desoksüribonukleotiidtrifosfaat (ingl *deoxyribonucleotide triphosphate*)

EDTA –etüleendiamiintetraädikhape (ingl *ethylenediaminetetraacetic acid*)

I –isoleutsiin (ingl *isoleucine*)

ISO –isopropanool (ingl *isopropanol*)

mRNA –informatsiooni-RNA (ingl *messenger RNA*)

P –proliin (ingl *proline*)

PROP –6-n-propüülthiouratsiil (ingl *6-n-propylthiouracil*)

PTC –fenüülthiokarbamiid (ingl *phenylthiocarbamide*)

RFLP –restriktsiooni fragmendi pikkuse polümorfism (ingl *restriction fragment length polymorphism*)

SDS –naatriumdodetsüülsulfaat (ingl *sodium dodecyl sulfate*)

SNP –üksiknukleotiidne polümorfism (ingl *single nucleotide polymorphism*)

TBE –Tris-boraat-EDTA (ingl *Tris-Borate-EDTA*)

TRC –maitseretseptorrakud (ingl *taste-receptor cells*)

V –valiin (ingl *valine*)

SISSEJUHATUS

Maitsetundlikkus on inimeste kaasündinud sensoorne omadus, mille abil on võimalik tuvastada tarbitavaid toitaineid ning samal ajal vältida toksiinide ja raskesti seeditavate ühendite sattumist söögiks (Chaudhari ja Roper, 2010). Inimestele on see igapäevaseks viisiks ära tunda ja eristada viit põhimaitset, milleks on magus, umami, hapu, soolane ja mõru (Chaudhari ja Roper, 2010). Üks enim uuritud maitsekomponente on mõrudus, mille tajumine tekitab inimestes sageli negatiivset reaktsiooni ning evolutsiooniliselt on mõru maitse tundmise eesmärk olnud kaitsta inimesi potentsiaalselt mürgiste ainete tarbimise eest (Wang jt., 2022).

Inimestel on 25 erinevat funktsionaalset mõru maitse tundlikkusega seotud TAS2R geeni, mille produktid reguleerivad mõru maitse tundmist ning sellest geenide perekonnast on enim uuritud geen TAS2R38, mis seda otseselt mõjutab (Wang jt., 2022). Erinevused TAS2R38 geenis põhjustavad ka inimeste vahelisi erinevusi mõru maitse tajumisel, mõned on selle suhtes väga tundlikud ega talu mõrudust, teised aga tundetumad või isegi täiesti tundetud (Boxer ja Garneau, 2015). Need erinevused võivad oluliselt mõjutada inimeste toiduvalikut ja toitumisharjumusi (Chaudhari ja Roper, 2010).

Käesolev bakalaureusetöö on valminud Tartu Ülikooli geenitehnoloogia õppekava raames. Bakalaureusetöö põhieesmärk on välja töötada suljest eraldatava genoomse DNA põhine protokoll mõru maitse tundlikkusega seotud kolme üksiknukleotiidse polümorfismi (rs713598, rs1726866 ja rs10246939) tuvastamiseks inimese TAS2R38 geenis, mille põhjal on võimalik näitlikustada seoseid fenotüübiliste tunnuste ja DNA-s esinevate variatsioonide ehk genotüübi vahel kombineerides PCR-i Sangeri sekveneerimisega. Lisaks on töö eesmärgiks saada hinnang kolme mõru maitse tundlikkusega seotud SNP-i alleelisageduste, genotüüpide ja maitsetundlikkuse fenotüübiliste seoste kohta 20 vabatahtlikust indiviidist koosnevas valimis.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

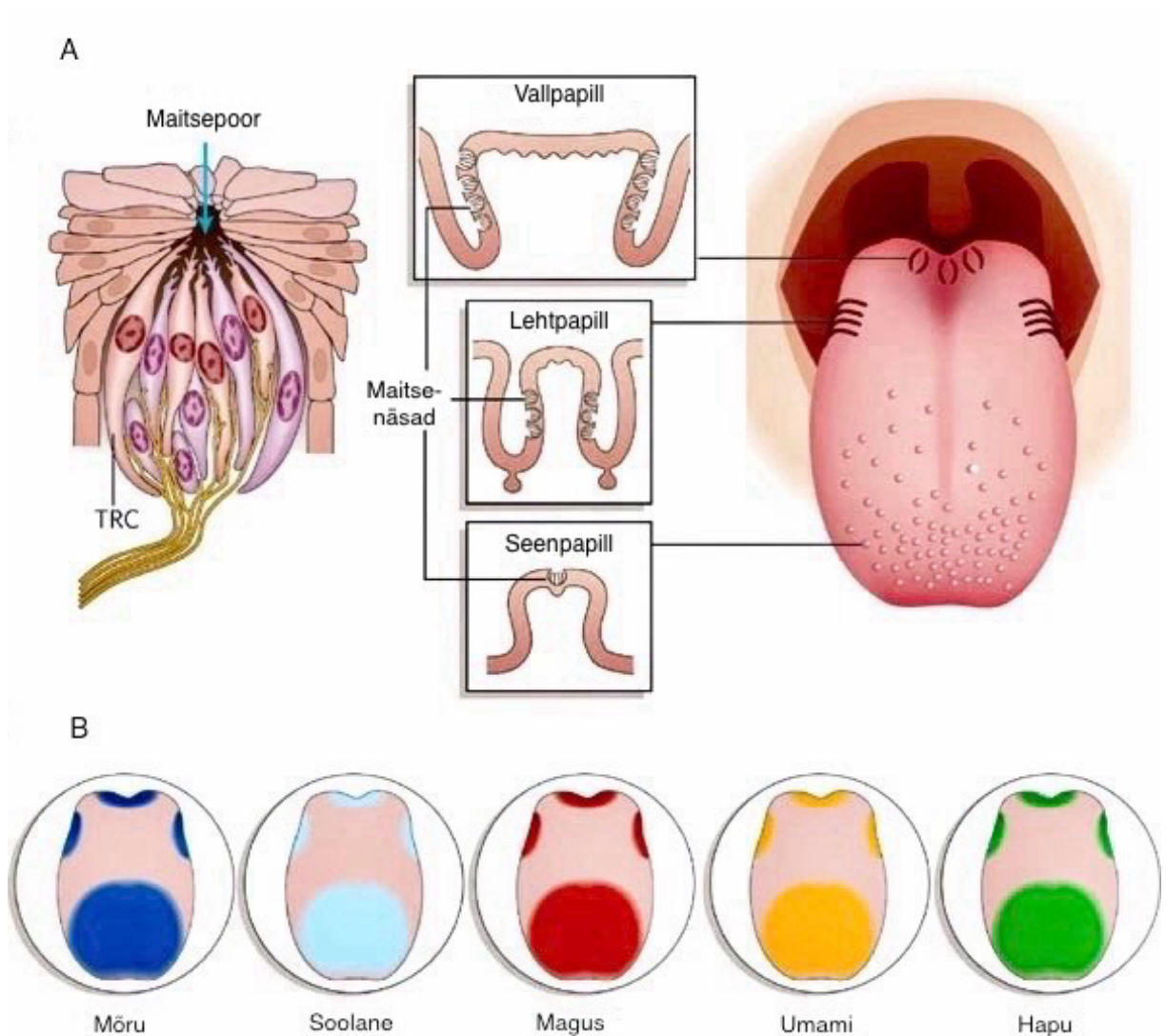
1.1. Maitseretseptorid

Maitsetundlikkus on inimeste kaasasündinud sensoorne omadus, mille abil on võimalik tuvastada tarbitavaid toitaineid ning samal ajal vältida toksiinide ja raskesti seeditavate ühendite sattumist toiduks. Inimestele on see igapäevaseks viisiks ära tunda ja eristada viit põhimaitset, milleks on magus, umami, hapu, soolane ja mõru. Arvatakse, et need kõik annavad meile informatsiooni toidu koostise ning meie keha füsioloogiliste vajaduste kohta (Chaudhari ja Roper, 2010; Drayna, 2005).

Magusamaitsetelised toidud saavad signaali süsivesikute olemasolu kohta, mis on inimestele energiaallikaks. Soolane maitse reguleerib aga naatriumi ja teiste soolade tarbimist, aidates niimoodi säilitada keha veetaset ning vereringet. Toidu valgusisalduse kohta saame teavet umami, L-glutamaadi ja mõnede teiste L-aminohapete maitse tundlikkuse järgi (Chaudhari ja Roper, 2010). Hapu maitse tundlikkus on eelkõige seotud toiduhapete olemasoluga, mis on üldiselt inimestele pigem vastik, seetõttu välditakse liigsete hapete tarbimist ja allaneelamist, hoides nii ära keha happe-aluse tasakaalu säilitavate mehhanismide üle koormamise. Lisaks on riknenud toiduained sageli happelised, mis põhjustab hapu maitse vältimist (Chaudhari ja Roper, 2010; Shaji and Saraswathy, 2023).

Viiendaks põhimaitseks on mõrudus, mis on inimestele loomupäraselt vastumeelne ja selle tundmine tekitab negatiivse reaktsiooni (Wang jt., 2022). Vastupidiselt näiteks magusa ja umami maitsete tundmisele, mille eesmärgiks on teatud toitainete tuvastamine toidust, on suus leiduvate mõru maitse retseptorite evolutsiooniline eesmärk kaitsta inimesi erinevate toksiliste ainete tarbimise eest (Chandrashekar jt, 2000; Chandrashekar jt, 2006; Chaudhari ja Roper, 2010).

Arvatakse, et erinevused maitse-eelistustes tulenevad osaliselt maitseretseptorite geneetilisest erinevusest indiviidide vahel ning need võivad oluliselt mõjutada inimeste toiduvalikut ja toitumisharjumusi (Chaudhari ja Roper, 2010). Maitsetuvastuse anatoomilisteks substraatideks ja ühikuteks on maitseretseptorirakud (TRC, ingl *taste-receptor cells*), mis on koondatud maitsepungadeks ning jagunevad keele- ja suuepiteeli erinevate papillide vahel. Vastupidiselt üldlevinud uskumusele, et põhimaitseid tuntakse keele erinevates piirkondades, arvatakse, et maitsetundlikkus on kõikide põhimaitsete suhtes jaotunud ühtlaselt üle keele (joonis 1) (Chandrashekar jt, 2006).



Joonis 1. Maitsenäsad, maitsepungad ja retseptorrakud. A. Maitsepungad ehk -karikad (vasakul) koosnevad liigist sõltuvalt umbes 50–150 retseptorrakust (TRC). Inimeste keelel on kolme liiki maitsenäsasid ehk -papille: vall-, leht- ja seenpapillid. Vallpapillid asuvad keele posterioorses osas. Lehtpapillid asuvad keele tagaosas külgedel. Seenpapillid asuvad keele eesmises osas. B. Vastupidiselt üldlevinud arvamusele, et erinevaid maitseid tajuvad keele erinevad piirkonnad, on maitsetundlikkus kõikide põhimaitsete suhtes jaotunud ühtlaselt üle keele. Joonis on kohandatud (Chandrashekar jt, 2006).

1.2. TAS2R geeniperekond

TAS1R ja TAS2R on peamised maitseretseptorite geeniperekonnad, mis suudavad tuvastada suurt hulka maitseomadusi, sealhulgas magusust, umamit ning mõrudust. Kui esimesed kaks on reguleeritud TAS1R geenide poolt, siis tarbitava aine mõruduse tajumist mõjutavad TAS2R perekonna geenid (Shaji and Saraswathy, 2023; Drayna, 2005).

Inimeste keelel olevate maitsepungade rakkude pinnal asub mõru maitse retseptorvalkude grupp, mis vahendab kibeda maitse aistingut (Adler jt, 2000). Inimestel on 25 erinevat funktsionaalset mõru maitse tundlikkusega seotud TAS2R geeni, mille produktid reguleerivad

mõru maitse tundmist. Nendest 15 asuvad klastrina 12. kromosoomis, üheksa paiknevad klastrina seitsmendas kromosoomis ja ühe selle geeniperekonna liikme võime leida viiendast kromosoomist (Shi jt, 2003; Adler jt, 2000). Sellest geenide perekonnast on enim uuritud geen TAS2R38, mis asub seitsmendas kromosoomis ja reguleerib otseselt inimeste mõru maitse tundlikkust (Wang jt., 2022).

1.3. TAS2R38 geen

TAS2R38 on mõru maitse retseptori geen, mis mõjutab otseselt inimese mõru maitse tajumist. Täpsemalt määrab TAS2R38 seda, kas inimene tunneb fenüülitiokarbamiidi (PTC, ingl *phenylthiocarbamide*), 6-n-propüülitiouratsiili (PROP, ingl *6-n-propylthiouracil*) ja nendega seotud ühendeid või mitte. See mõjutab nii inimese toitumiseelistusi kui ka tervislikku seisundit (Boxer ja Garneau, 2015). Mõru maitse tundmine on inimestele evolutsiooniliselt väga vajalik, sest seda tajutakse peamiselt negatiivsena ning seeläbi on inimkond saanud end kaitsta võimalike ohtude eest, näiteks looduses leiduvate mürkide ja teiste potentsiaalselt ohtlike ainete tarbimise eest (Wang jt., 2022). Lisaks sellele, et TAS2R38 määrab suuresti meie toidulaua, on leitud seoseid ka retseptori ning kehakaalu, suitsetamise, alkoholi tarbimise ja immuunsuse vahel (Keller jt., 2013; Tepper jt., 2014). Näiteks on selgunud, et PTC suhtes tundlikud inividid, inimesed, kes tajuvad mõru maitset tugevamalt, ei ole nii varmad suitsetama, sest sigarettide tugevalt mõru maitse tekitab neis negatiivset reaktsiooni (Risso jt., 2016). Samuti on kehakaalu ja mõru maitse tundlikkuse seose uurimisel leitud, et katsealused, kes seda ei tunne, on sageli kõrgema kehamassiindeksiga kui need, kes tunnevad mõru maitset keskmiselt või tugevalt (Feeney jt., 2011).

TAS2R38 geen sisaldab ainult ühte eksonit ja toodab mRNA-d (informatsiooni-RNA, ingl *messenger RNA*), mille pikkus on 1143 aluspaari (bp, ingl *base pair*). TAS2R38 sisaldab kolme üksiknukleotiidset polümorfismi (SNP, ingl *single nucleotide polymorphism*), rs713598, rs1726866 ja rs10246939, mis asuvad vastavalt positsioonidel 145, 785 ja 886 aluspaari mRNA algusest (Wang jt., 2022; Drayna, 2005). Nende SNP-de tulemuseks on vastavalt proliini (P, ingl *proline*) asendamine alaniiniga (A, ingl *alanine*) aminohappe positsioonil 49 (P49A), alaniini asendamine valiiniga (V, ingl *valine*) asendis 262 (A262V) ja valiin isoleutsiiniga (I, ingl *isoleucine*) positsioonis 296 (V296I) (Wang jt., 2022; Drayna, 2005). Rs713598 on üks kolmest SNP-st, mis moodustab peamised PTC ja sarnaste molekulide kibeda maitse tundmisega seotud haplotüübid ning on aluseks võimele tajuda eri toitudes, näiteks kapsas ja toores brokoli või jookides nagu kohv ja õlu, mõru maitset. C-alleeli kandjad, enamasti

homosügoidid (C-C), on näidanud PTC suhtes üles suuremat tundlikkust, samas kui G-alleeli kandjad ei tunne seda üldse või siis tajusid mõrudust palju nõrgemini (Colares-Bento jt., 2012).

Uuritaval TAS2R38 geenil on kaheksa haplotüüpi: PAV, PAI, PVV, PVI, AAV, AAI, AVV ja AVI (tabel 1). Neist levinuimad on dominantne PAV ja retsessiivne AVI. PAV haplotüübiga tajutakse mõru maitset tugevamalt kui AVI-ga. Haplotüübid AAV, AAI, PAI ja PVI on aga haruldasemad (Boxer ja Garneau, 2015; Kim jt., 2003). Võrreldes kahte uuringut, millest üks viidi läbi Hiinas ning teine Ameerikas, nähtub, et mõlema uuringu eesmärk oli populatsioonis välja selgitada haplotüüpide sagedused ning seeläbi mõista milliseid inimesi on valimis rohkem: kas mõru maitsele tundlikke või neid, kes kibedust ei taju (Wang jt., 2022; Boxer ja Garneau, 2015). Selgus, et Ameerikas läbi viidud uuringus oli kõige rohkem AVI haplotüübiga inimesi (53,1%) – sellest nähtub, et vastavas uurimisgrupis olnud inimesed ei tunne mõru maitset nii tugevalt. Samas uuringus selgus, et PAV haplotüübiga indiviide oli 42,3% (Boxer ja Garneau, 2015). Vastupidiselt ameeriklastele, ilmnes aga, et hiinlaste seas on PAV haplotüübiga inimesi palju rohkem (66,1%) ning AVI haplotüüpi esines oluliselt vähem (11,6%) (Wang jt., 2022). Nende teadmiste põhjal saab edasi uurida, millest tulenevad erinevused inimeste mõru maitse tundlikkuses ja miks on see piirkonniti erinev. Lisaks saab inimese genotüüpi teades anda ka vastavaid toitumissoovitusi (Wang jt., 2022).

Tabel 1. TAS2R38 geeni haplotüübid. Tabelis on näidatud haplotüübid ning nendele vastavad SNP-d koos alleelide ja aminohappega selles positsioonis. Tabel on koostatud artiklite põhjal (Boxer ja Garneau, 2015; Kim jt., 2003).

Haplotüüp	SNP rs713598 alleel	SNP rs1726866 alleel	SNP rs10246939 alleel	Aminohape positsioonis 49	Aminohape positsioonis 262	Aminohape positsioonis 296
PAV	C	C	G	Proliin	Alaniin	Valiin
PAI	C	C	A	Proliin	Alaniin	Isoleutsiin
PVV	C	T	G	Proliin	Valiin	Valiin
PVI	C	T	A	Proliin	Valiin	Isoleutsiin
AAV	G	C	G	Alaniin	Alaniin	Valiin
AAI	G	C	A	Alaniin	Alaniin	Isoleutsiin
AVV	G	T	G	Alaniin	Valiin	Valiin
AVI	G	T	A	Alaniin	Valiin	Isoleutsiin

1.3.1. TAS2R38 geeni SNP-e käsitlevate uuringute võrdlus

Üks enim uuritud maitsekomponente on mõrudus ning sellega koos inimestel mõru maitse tundlikkust reguleeriv TAS2R38 geen (Wang jt., 2022; Drayna, 2005). Maailmas on läbi viidud erinevaid uuringuid, mis keskenduvad TAS2R38 geeni üksiknukleotiidsetele polümorfismidele ning mõru maitse tundmise alleeli esinemissagedusele vastavates positsioonides (tabel 2).

Tabel 2. Erinevate TAS2R38 geeni üksiknukleotiidseid polümorfisme uurinud uurimistööde tulemuste võrdlus. Tabelis on näidatud uuritud SNP, populatsioon, kus uuring läbi viidi, valimi suurus, mõru maitse tundmisega seotud alleeli esinemissagedus ning vastav alleel on välja toodud sulgudes. Samuti on tabelis näidatud allikas, kust vastavad uuringuandmed pärinevad.

Uuritud SNP	Populatsioon	Valimi suurus	Mõru maitse tundmise alleeli esinemissagedus	Allikas
rs713598	Ameerika Ühendriigid (europiidid)	56	0,51 (C)	Behrens jt., 2013
rs713598	India	393	0.31 (C)	Deshaware ja Singhal, 2017
rs713598	Iirimaa	581	0,42 (C)	Feeney jt., 2011
rs713598	Hiina	320	0,66 (C)	Wang jt., 2022
rs713598	Ameerika Ühendriigid (europiidid)	50	0,55 (C)	Wooding jt., 2010
rs1726866	Ameerika Ühendriigid (europiidid)	56	0,57 (C)	Behrens jt., 2013
rs1726866	India	393	0,32 (C)	Deshaware ja Singhal, 2017
rs1726866	Iirimaa	581	0,47 (C)	Feeney jt., 2011
rs1726866	Hiina	320	0,88 (C)	Wang jt., 2022

rs1726866	Ameerika Ühendriigid (europiidid)	50	0,61 (C)	Wooding jt., 2010
rs10246939	Ameerika Ühendriigid (europiidid)	56	0,54 (G)	Behrens jt., 2013
rs10246939	Korea	3502	059 (G)	Benish ja Choi, 2023
rs10246939	India	393	0,34 (G)	Deshaware ja Singhal, 2017
rs10246939	Iirimaa	581	0,47 (C)	Feeney jt., 2011
rs10246939	Hiina	320	0,68 (G)	Wang jt., 2022
rs10246939	Ameerika Ühendriigid (europiidid)	50	0,55 (G)	Wooding jt., 2010

2. EKSPERIMENTAALOSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö peamiseks eesmärgiks on välja töötada süljest eraldatava genoomse DNA põhine protokoll mõru maitse tundlikkusega seotud kolme SNP (rs713598, rs1726866 ja rs10246939) tuvastamiseks inimese TAS2R38 geenis, mida saaks tulevikus kasutada biotehnoloogia õppetoolis läbiviidavates praktikumides praktilise tööna, õpetamaks tudengitele levinud molekulaarbioloogia meetodeid. Lisaks on töö eesmärgiks saada hinnang kolme mõru maitse tundlikkusega seotud SNP-i alleelisageduste, genotüüpide ja maitsetundlikkuse fenotüübiliste seoste kohta 20 vabatahtlikust indiviidist koosnevas valimis. Töö eesmärkide täitmiseks vajalikke etappe ning teostamise järjekorda on kujutatud joonisel 2.

Vabatahtlikelt süljeproovi kogumine ning
maitsetundlikkuse testimine PTC ja PROP
testribadega



Genoomse DNA eraldamine
süljest



PCR



Sangeri sekveneerimine



Fenotüübi ja genotüübi vaheliste seoste
analüüs

Joonis 2. Eksperimentaalsosa tööetapid ning nende teostamise järjekord.

2.2. Materjal ja meetodika

2.2.1. Maitsetundlikkuse testimine

Uuringu läbiviimiseks ning vabatahtlike indiviidide kasutamiseks valimis on saadud Tartu Ülikooli eetikakomitee kooskõlastus nr 387/T-18.

Uuringu valim koosneb kahekümnest vabatahtlikust indiviidist, kes leiti uuringu teostajate töökaaslaste ja Tartu Ülikooli üliõpilaste seast. Valimisse kaasati ainult täisealisi, nii nais-, kui

ka meessoost isikuid. Enne uuringuga alustamist koguti igalt osalejalt allkirjastatud teadliku nõusoleku vorm. Informeeritud otsuse tegemiseks anti igale vabatahtlikule uuringust põhjalik ülevaade, et selgitada töö eesmärki, protsessi ja indiviidi õigusi uuringus osalemisel.

Vabatahtlikelt uuringus osalejatelt koguti vähemalt 1 ml sülge, millest eraldati genoomne DNA (peatükk 2.2.2) ning polümorfismide uurimiseks kasutati PCR-i (polümeraasi ahelreaktsiooni) kombineerituna Sangeri sekveneerimisega (peatükk 2.2.4 ja 2.2.5). Indiviidide antud süljeproovid tähistati koodiga, et tagada tulemuste anonüümsus. Seejärel paluti vabatahtlikel hinnata mõru maitse tundlikkust PTC ja PROP testribade (PL Precision Laboratories #165, #125) maitsemisel. Indiviidid hindasid enda mõru maitse tundlikkust skaalal nullist viieni, kus null tähistas kõige nõrgemat ning viis kõige tugevamat maitse intensiivust. Selleks, et tagada võimalikult tõesed andmed, paluti vabatahtlikel 30 minuti jooksul enne maitsetundlikkuse testimist vältida maitserikaste toitude ja jookide tarbimist. Saadud andmete põhjal on võimalik näitlikustada seoseid fenotüübiliste tunnuste ja DNA-s esinevate variatsioonide ehk genotüübi vahel.

2.2.2. DNA eraldamine ja kontsentratsiooni mõõtmine

Genoomse DNA eraldamiseks koguti vabatahtlikelt 50 ml tuubi vähemalt 1 ml sülge, millest 500 µl lisati seejärel 500 µl lüüsipuhvrile (50 mM TrisHCl pH 8.0, 50 mM EDTA (etüleendiamiintetraäädikhape, ingl *ethylenediaminetetraacetic acid*), 100 mM NaCl, 1.75% SDS (naatriumdodetsüülsulfaat, ingl *sodium dodecyl sulfate*)) ning suspendeeriti. Segule lisati 20 µl proteinaas K (20 mg/ml, Qiagen). Pärast segamist *vortex*-il (Fisher Scientific) inkubeeriti proovi 30 minutit 56 °C juures (Thermo Block TDB – 120, Biosan). Seejärel lisati tuubi 200 µl 5 M NaCl ning inkubeeriti viis minutit jääs. Madala temperatuuri ja kõrge Na⁺ (1 M) kontsentratsiooni juures hakkab SDS välja sadenema ja selle eraldamiseks tsentrifuugiti (Eppendorf *Centrifuge* 5415 R) lahust viis minutit 4 °C juures maksimaalsetel pööretel (13 200 rpm). Eraldatav genoomne DNA jääb vesilahusesse, seega pipeteeriti 500 µl vesilahust uude tuubi sadet puudutamata, lisati samas mahus (500 µl) isopropanooli (ISO, ingl *isopropanol*) ning segati *vortex*-il. Proovi inkubeeriti viis minutit toatemperatuuril ja seejärel tsentrifuugiti taas viis minutit 4 °C juures maksimaalsetel pööretel. Peale seda eemaldati lahus DNA sadet puudutamata ning tuubi lisati 300 µl 70% etanooli (70% EtOH), mille järel viidi läbi viimane tsentrifuugimine kahe minuti jooksul 4 °C juures maksimaalsetel pööretel. Pärast tsentrifuugimist eemaldati etanool nii, et sade jääks võimalikult kuiv ja tuubi inkubeeriti lahtise kaanega 37 °C juures 10 minutit. Viimase sammuna lahustati sade suspendeerides ning *vortex*-il segades 50 µl destilleeritud vees (mQ). Eraldatud DNA kontsentratsiooni mõõtmiseks

kasutati NanoDrop One masinat (Thermo Scientific) ning vajadusel lahjendati eraldatud DNA-d nii, et lõppkontsentratsioon oleks 50 ng/μl.

2.2.3. Praimerite disain

DNA analüüsiks vajalikud praimerid (Metabion international AG) leiti esmalt relevantsest teaduskirjandusest (tabel 3), misjärel neid testiti PCR-il ning lahutati ja visualiseeriti geelelektrofooresil, mõlema komponentide ja läbiviimise kohta on täpsem informatsioon peatükis 2.2.4.

Tabel 3. Teaduskirjanduse põhjal valitud praimerid. Tabelis on näidatud SNP, mille amplifitseerimiseks primereid kasutati, praimerite järjestused 5' → 3' suunal ja kas tegemist on pärisuunalise (F) või pöördsuunalise (R) praimeriga, praimerite sulamistemperatuur ning samuti allikas, kust vastav praimeripaar pärineb.

SNP	Praimeri-paari nimetus	Järjestused 5' → 3' suunal	T _m (°C)	Produkti eeldatav pikkus (bp)	Allikas
rs713598, rs1726866, rs10246939	TAS2R38 – 1	ACCAATGCCTTCGTTTT CTTGGTGA (F) TCACAGCTCTCCTCAAC TTGGCA (R)	64 (F) 65 (R)	831	Boxer ja Garneau, 2015
rs1726866	TAS2R38 – 2	AACTGGCAGATTAAG ATCTCAATTTAT (F) AACACAAACCATCACC CCTATTTT (R)	61 (F) 60 (R)	303	LaBronte ja Beers, 2015
rs713598, rs1726866, rs10246939	TAS2R38 – 3	TTGACTCTAACTCGCAT CCGC (F) TCAGCACAGTGTCGG GAAT (R)	61 (F) 57 (R)	999	Wang jt., 2022
rs713598	TAS2R38 – 4	CCTTCGTTTTCTTGGTG AATTTTTGGGATGTAGT GAAGAGGCGG (F) AGGTTGGCTTGGTTTGC AATCATC (R)	79 (F) 64 (R)	221	CUNY Academic Works, BIO2450L Genetics Laboratory Manual

Uute praimerite disainimiseks kasutati veebiprogrammi Primer3 (tabel 4). Praimereid (Metabion international AG) testiti PCR reaktsioonil kasutades sama programmi, mida eelnevalt ning tulemused lahutati ja visualiseeriti taas geelelektrofooresil (peatükk 2.2.4). TAS2R38 geeni üksiknukleotiidsed polümorfismid rs1726866 ja rs10246939 asuvad üksteisest vaid 102 aluspaari kaugusel, vastavalt positsioonidel 785 ja 886, seega otsustati nende tuvastamiseks disainida praimerid, millega saab amplifitseerida mõlemad SNP-id üheaegselt. Kuna SNP rs713598 asub kaugemal, positsioonil 145 bp, disainiti selle üksiknukleotiidsed polümorfismi tuvastamiseks eraldi praimerid.

Tabel 4. Programmiga Primer3 disainitud praimerid. Tabelis on näidatud SNP, mille amplifitseerimiseks praimereid kasutati, praimerite järjestused 5' → 3' suunal ja kas tegemist on pärisuunalise (F) või pöördsuunalise (R) praimeriga. PCR produktide suurused on näidatud aluspaarides (bp).

SNP	Praimeripaari nimetus	Praimerite järjestused 5' → 3' suunal	T _m (°C)	Produkti eeldatav pikkus (bp)
rs713598	rs713598_PTC_1	CTGGAAGTGGGTAAGCTGGA(F) TCCGCACTGTGTCCTATGAA (R)	60 (F) 58 (R)	227
rs713598	rs713598_PTC_2	AGGTTGGCTTGGTTTGCAAT (F) TGGAGTTTGCAGTGGGGTTT (R)	56 (F) 58 (R)	250
rs1726866, rs10246939	2SNP_PTC_1	GTCCGGGAATCTGCCTTGT (F) AGAAACTCTCGTGACCCCAG(R)	59 (F) 60 (R)	299
rs1726866, rs10246939	2SNP_PTC_1B	AGCTCTCCTCAACTTGGCAT (F) AGAAACTCTCGTGACCCCAG (R)	58 (F) 60 (R)	228
rs1726866, rs10246939	2SNP_PTC_2	CATTCTCAGCACAGTGTCCG (F) CTGACTGTCTCCCTGGGAAG (R)	60 (F) 63 (R)	362
rs1726866, rs10246939	2SNP_PTC_3	TGTCCATTCTCAGCACAGTG (F) TCTGGGATGCTGACTGTCTC (R)	58 (F) 60 (R)	375

2.2.4. PCR

PCR-il kasutati vabatahtlikelt indiviididelt eraldatud DNA-d ning eelmises peatükis (2.2.3) näidatud praimeripaare (tabel 3, tabel 4). PCR-i tegemiseks vajalikud komponendid segati kokku 20 µl lõppmahus 200 µl PCR tuubidesse (tabel 5). Polümeraasi ahelreaktsiooni kasutati samadel tingimustel nii praimerite testimisel kui DNA amplifitseerimisel enne Sangeri sekveneermist.

Tabel 5. Polümeraasi ahelreaktsiooniks vajalikud komponendid ja kogused ühe reaktsiooni jaoks, mille lõppmaht on 20 µl.

Komponent	Kogus 1 reaktsiooni jaoks (20 µl)
Puhver HOT FIREPol® 10x <i>Buffer</i> B1 (Solis BioDyne)	2 µl
25 mM MgCl ₂ (Solis BioDyne)	1,2 µl
2,5 mM dNTP (desoksüribonukleotiidtrifosfaat, ingl <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> ; Solis BioDyne)	2 µl
Polümeraas HOT FIREPol® <i>Polymerase</i> (5 U/µl, Solis BioDyne)	0,2 µl
mQ	11,6 µl
Praimerite segu (10 mM)	2 µl
Eraldatud DNA (50 ng/µl)	1 µl

Polümeraasi ahelreaktsioon viidi läbi PCR masinas (Biometra, TProfessional Basic Thermocycler) järgmise programmiga:

95 °C 15 min
95 °C 30 sek
60 °C 30 sek
72 °C 40 sek
72 °C 10 min
4 °C lõpp

} 30 tsüklit

PCR produktide lahutamiseks ning visualiseerimiseks valmistati 1,5% agarosgeel. Geeli valmistamisel kasutati agarooosi (Fisher Bioreagents) ja 0,5x TBE (Tris-boraat-EDTA, ingl *tris-Borate-EDTA*) puhvrit ning DNA visualiseerimiseks lisati 150 ml geeli kohta 7 µl etiidiumbromiidi (5 mg/ml). Enne geelile kandmist lisati proovidele 4 µl 6x DNA *Loading dye Buffer Orange and Blue* (Solis BioDyne) ühe reaktsiooni (20 µl) kohta. DNA fragmentide suuruse kindlaks tegemiseks pandi geelile 8 µl 100 bp DNA suurusmarkerit *Ready to Load* (Solis BioDyne). Geelelektroforees teostati tingimustel: 200 V 30 minutit.

2.2.5. Sangeri sekveneerimine

Kogutud DNA analüüsimiseks saadeti PCR produktid Genoomika Instituudi tuumiklaborisse, kus viidi DNA sekveneerimise täisteenuse tellimisel läbi Sangeri sekveneerimine Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer masinaga.

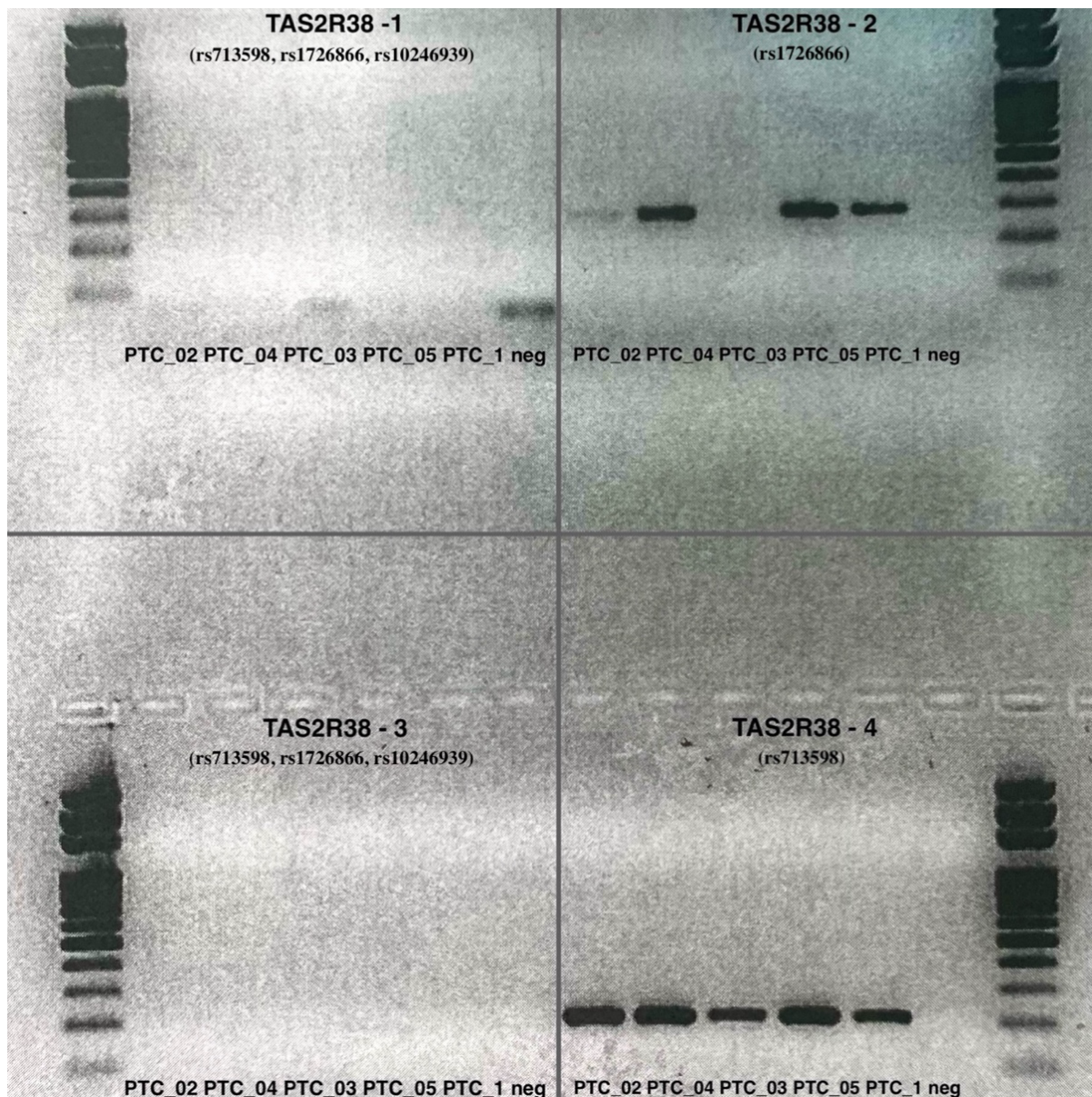
Sangeri sekveneerimise tulemused visualiseeriti programmiga SnapGene Viewer ja tulemuste analüüsiks vajalikud joonised loodi kasutades programmeerimiskeelt R ja tarkvaraprogrammi RStudio (pakett ggplot2).

2.3. Tulemused ja arutelu

2.3.1. Praimerite testimine ja valimine

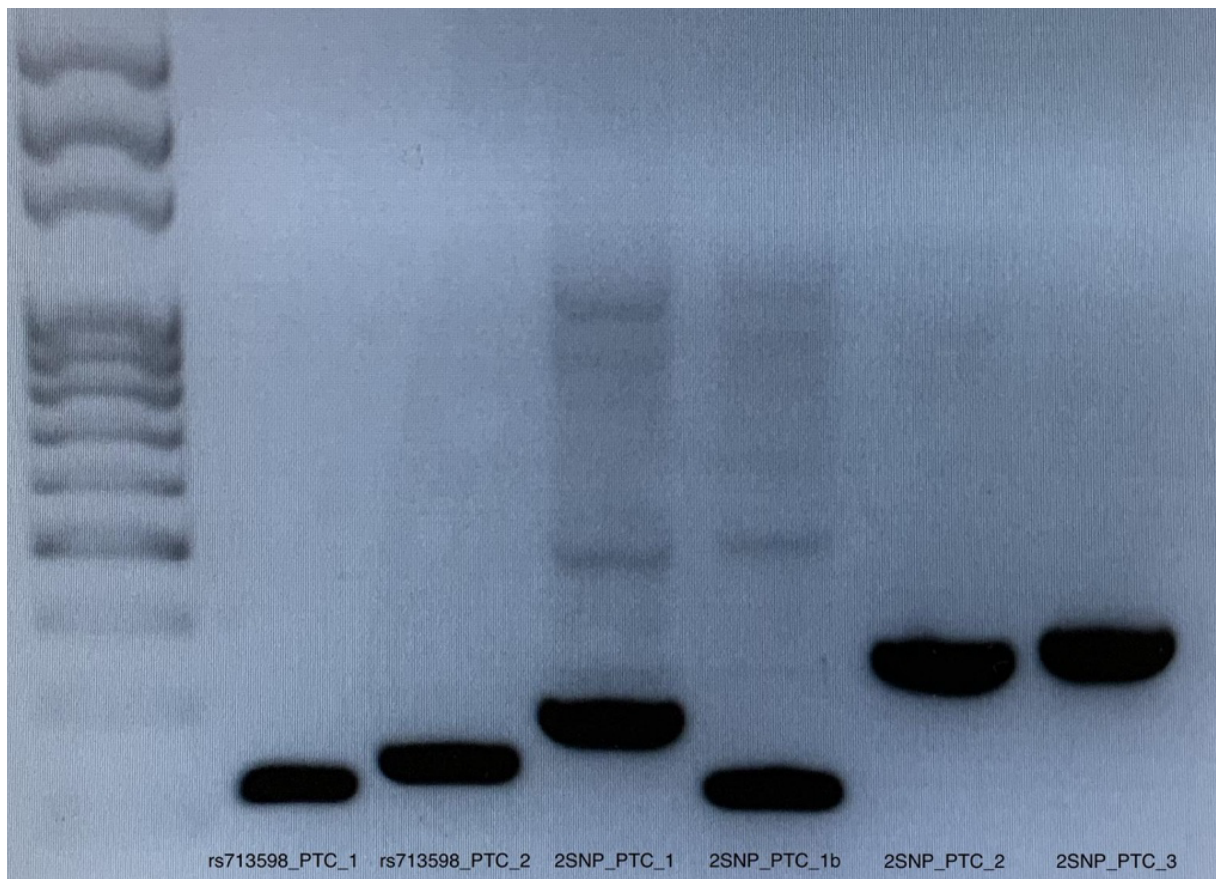
Vabatahlikelt indiviididelt kogutud genoomse DNA amplifitseerimiseks ja analüüsimiseks Sangeri sekveneerimisel sobilike praaimeripaaride välja selgitamiseks testiti esmalt relevantsest teaduskirjandusest valitud praimereid (tabel 3). Praimerite sobivust testiti PCR-il, mille komponendid (tabel 5) ja tingimused on täpsemalt kirjeldatud peatükis 2.2.4. PCR-i produktid visualiseeriti ja lahutati geelelektroforeesil (peatükk 2.2.4) (joonis 3). Jooniselt 3 nähtub, et praaimeripaari TAS2R38-2 puhul on PCR produktid oodatava pikkusega (tabel 3), kuid neid praimereid kasutades pole kõikide DNA-dega fragmente näha. TAS2R38-1 visualiseerimisel nähtavad fragmendid ei vasta oodatud suurusele (tabel 3). Samuti ilmneb, et tugevalt on nähtav fragment negatiivses kontrollis, samas kui DNA-d sisaldavate proovides on see fragment puudu või nõrgem ning tegemist on tõenäoliselt praimeri dimeeridega. TAS2R38-3 praimereid sisaldavate proovide puhul pole aga näha ühtegi fragmenti. Sellest saab järeldada, et esimese kolme praaimeripaari TAS2R38-1, TAS2R38-2 ja TAS2R38-3 puhul on tulemused kas osaliselt või täielikult puudulikud ning seetõttu ei sobi edasiseks kasutamiseks. Lisaks võib suuremate fragmentide (tabel 3) tulemusi mõjutada PCR programm, mille puhul peaks elongatsiooni aeg olema pikem. TAS2R38-4 praimerite puhul on tulemused küll geelelektroforeesil näha ning

vastavad ka oodatud pikkusele (tabel 3), kuid kuna selle praimeripaari pärisuunalise praimerisulamistemperatuur on selle pikkuse tõttu soovitus suurem (tabel 3) ning sama praimeris 3' otsas on referentsgenoomiga võrreldes *mismatch* (valepaardumine), otsustati PCR-i korrata uute iseseisvalt disainitud praimeritega.



Joonis 3. Teaduskirjanduse põhjal valitud praimerite testimiseks sooritatud PCR-i tulemuste visualiseerimine geelelektroforeesil. Joonisel on näidatud, millist praimeripaari kasutati ning pseudonüümitud DNA proovid, mida praimerite testimiseks kasutati. Lühend „neg“ tähistab negatiivset kontrolli.

Seejärel disainiti veel kuus praimeripaari (tabel 4), testimaks, kas PCR-i tulemusi on võimalik parandada. Neist kaks olid mõeldud rs713598 amplifitseerimiseks ning neli rs1726866 ja rs10246939 tuvastamiseks. Ka neid praimeripaare testiti polümeraasi ahelreaktsioonil eelpool mainitud tingimustel ning tulemused visualiseeriti geelelektroforeesil (peatükk 2.2.4) (joonis 4).



Joonis 4. Primer3 tarkvaraga disainitud praimerite testimiseks sooritatud PCR-i tulemuste visualiseerimine geelelektrofooresil.

Edasisteks analüüsideks valiti SNP rs713598 tuvastamiseks praimeripaar nimega rs713598_PTC_2 ja praimeripaar 2SNP_PTC_2 SNP-de rs1726866 ja rs10246939 tuvastamiseks, Sangeri sekveneerimisel kasutati rs713598_PTC_2 pöördsuunalist ja 2SNP_PTC_2 pärisuunalist praimerit. Valimisel peeti silmas praimerite testimiseks läbi viidud PCR-i tulemusi ning praimerite pikkuseid, seda eriti rs713598 tuvastamiseks mõeldud praimerite puhul (tabel 4).

2.3.2. Sangeri sekveneerimise tulemused

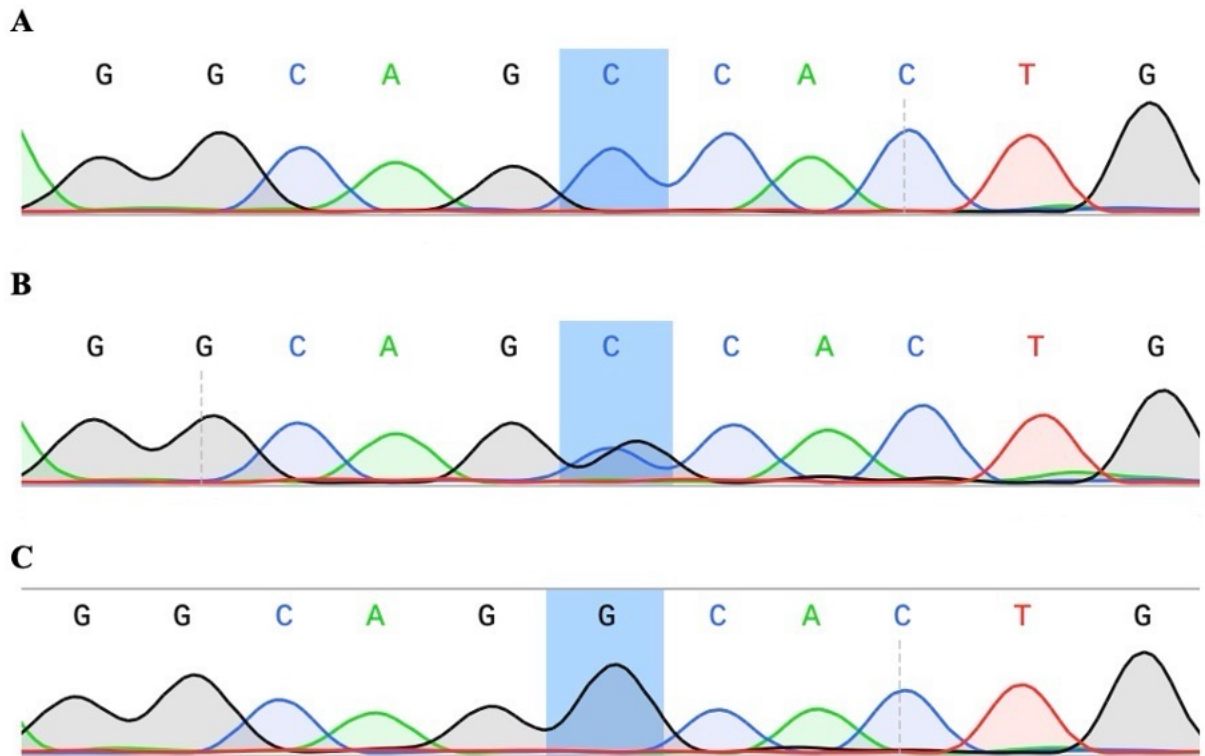
Antud bakalaureusetöö eesmärk oli välja töötada suljest eraldatava genoomse DNA põhine protokoll mõru maitse tundlikkusega seotud kolme SNP tuvastamiseks inimese TAS2R38 geenis. Töö käigus koguti uuringusse kaasatud kahekümnelt vabatahtlikult täiskasvanud inimeselt informatsiooni nende mõru maitse tundlikkuse kohta PTC ja PROP testribade maitsmisel ning määrati suljest eraldatud genoomse DNA põhjal maitsetundlikkusega seotud genotüüp vastava SNP-i asukohas Sangeri sekveneerimisel (tabel 6).

Mõru maitse tundlikkusega seotud alleelid antud SNP-des on C alleel positsioonil 145 (rs713598), G asukohal 785 (rs1726866) ja C alleel positsioonil 886 (rs10246939) ning

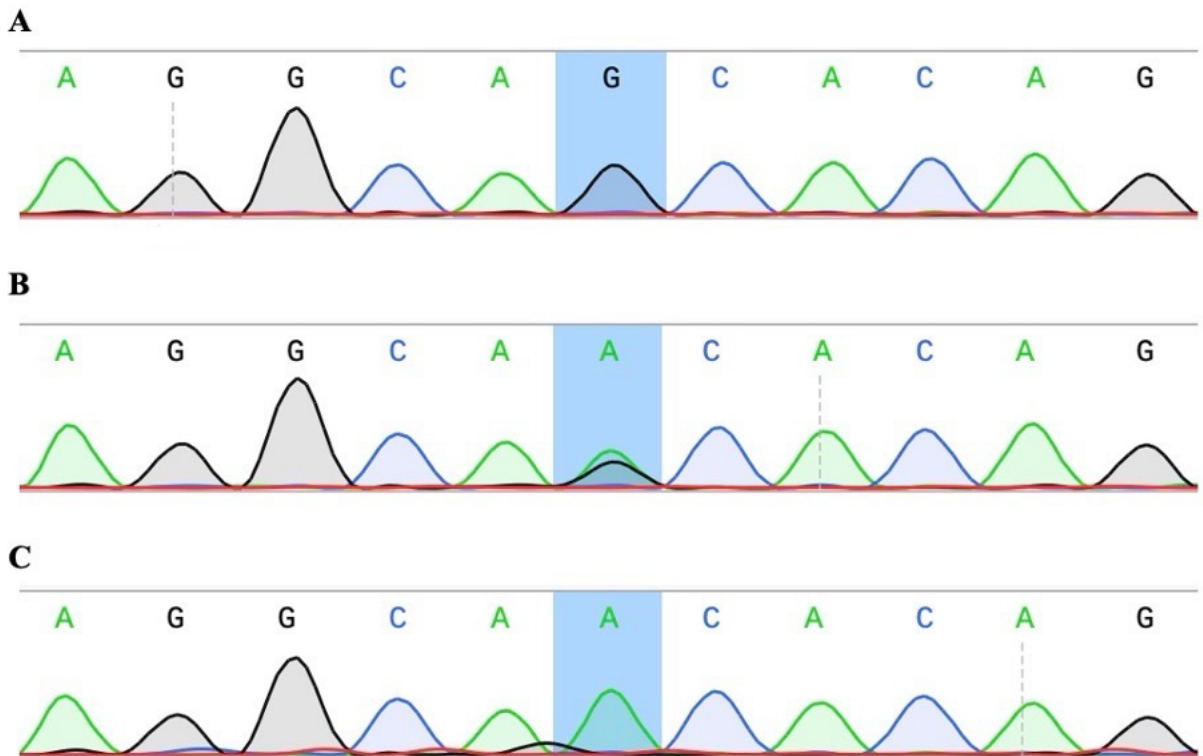
mõrudust mitte tundvad alleelid vastavalt G (G145, rs713598), A (A785, rs1726866) ja T (T886, rs10246939) (NCBI andmebaas; Wendell jt, 2010). SNPedia andmetel on kõikide nende üksiknukleotiidsete polümorfismide puhul dominantne mõru maitset tundev alleel, seega suure tõenäosusega tunnevad mõru maitset lisaks dominantsetele homosügootidele ka heterosügootid. Joonistel 5, 6 ja 7 on kujutatud pildid Sangeri sekveneerimise tulemuste DNA järjestustest kõigi kolme SNP-i kohta, näidates erinevaid genotüüpe, mis uuringus osalenud vabatahtlikel indiviididel esinesid.

Tabel 6. Sangeri sekveneerimise ja mõru maitse hinnangute tulemused. Tabelis on näidatud vabatahtliku indiviidi koodi järgi tema hinnang maitsetundlikkusele skaalal nullist viieni nii PTC kui PROP-i suhtes ning sekveneerimise tulemused SNP-de rs713598, rs1726866 ja rs10246939 kohta, kus mõru maitse tundlikkuse alleel on märgitud rasvaselt.

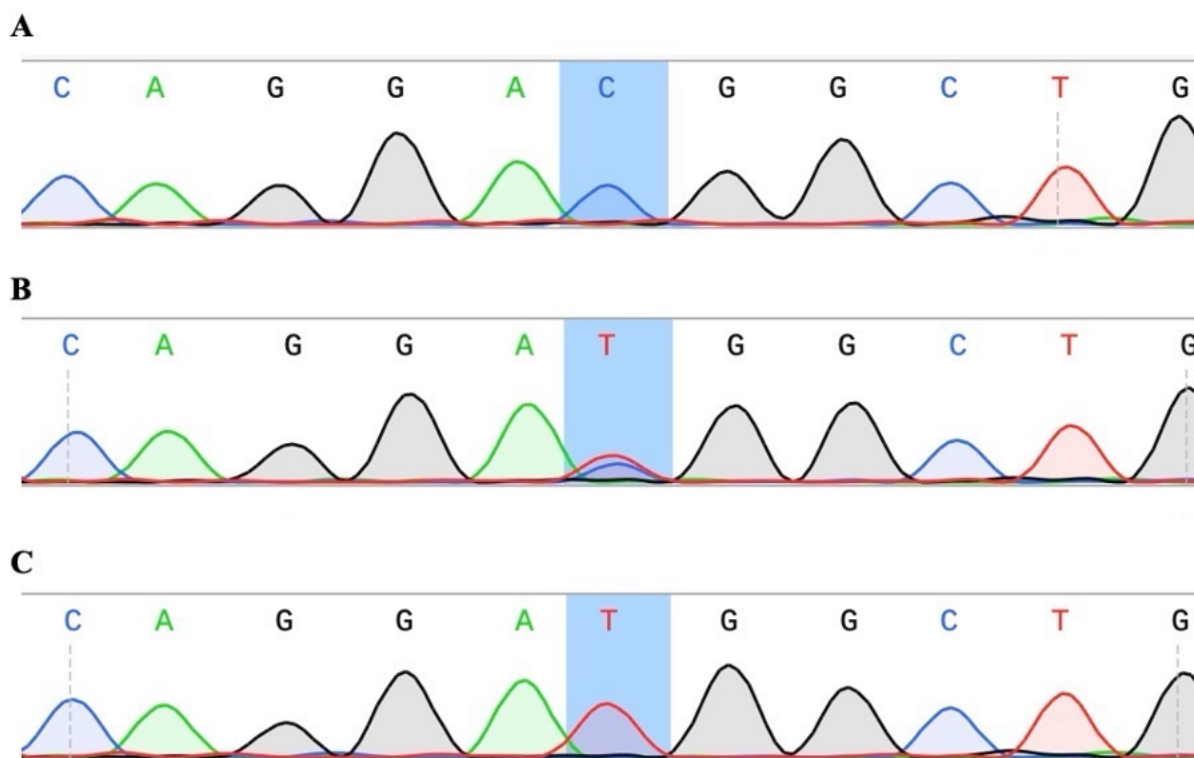
Vabatahtliku kood	PTC (0-5)	PROP (0-5)	rs713598 sekveneerimise tulemus	rs1726866 sekveneerimise tulemus	rs10246939 sekveneerimise tulemus
PTC_01	3	4	C/G	G/A	C/T
PTC_02	0	0	G/G	A/A	T/T
PTC_03	0	0	C/G	A/A	T/T
PTC_04	4	4	C/G	G/A	C/T
PTC_05	5	5	C/G	G/A	C/T
PTC_06	2	0	G/G	A/A	T/T
PTC_07	1	4	G/G	A/A	T/T
PTC_08	4	3	C/G	G/A	C/T
PTC_09	3	2	C/G	G/G	C/C
PTC_10	0	0	G/G	A/A	T/T
PTC_11	2	3	C/G	G/A	C/T
PTC_12	0	1	G/G	A/A	T/T
PTC_13	0	0	G/G	A/A	T/T
PTC_14	3	2	C/G	G/G	C/C
PTC_15	0	1	G/G	A/A	T/T
PTC_16	4	1	C/G	G/A	C/T
PTC_17	1	1	C/C	G/G	C/C
PTC_18	0	1	G/G	A/A	T/T
PTC_19	4	4	C/C	G/G	C/C
PTC_20	5	5	C/C	G/G	C/C



Joonis 5. Sangeri sekveneerimise tulemused SNP rs713598 kohta. A. C/C genotüübiga homosügoot, kes tunneb mõru maitset. B. C/G genotüübiga heterosügoot, kes tõenäoliselt tunneb mõru maitset. C. G/G genotüübiga homosügoot, kes ei tunne mõru maitset. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati programmi SnapGene Viewer.



Joonis 6. Sangeri sekveneerimise tulemused SNP rs1726866 kohta. A. G/G genotüübiga homosügoot, kes tunneb mõru maitset. B. G/A genotüübiga heterosügoot, kes tõenäoliselt tunneb mõru maitset. C. A/A genotüübiga homosügoot, kes ei tunne mõru maitset. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati programmi SnapGene Viewer.

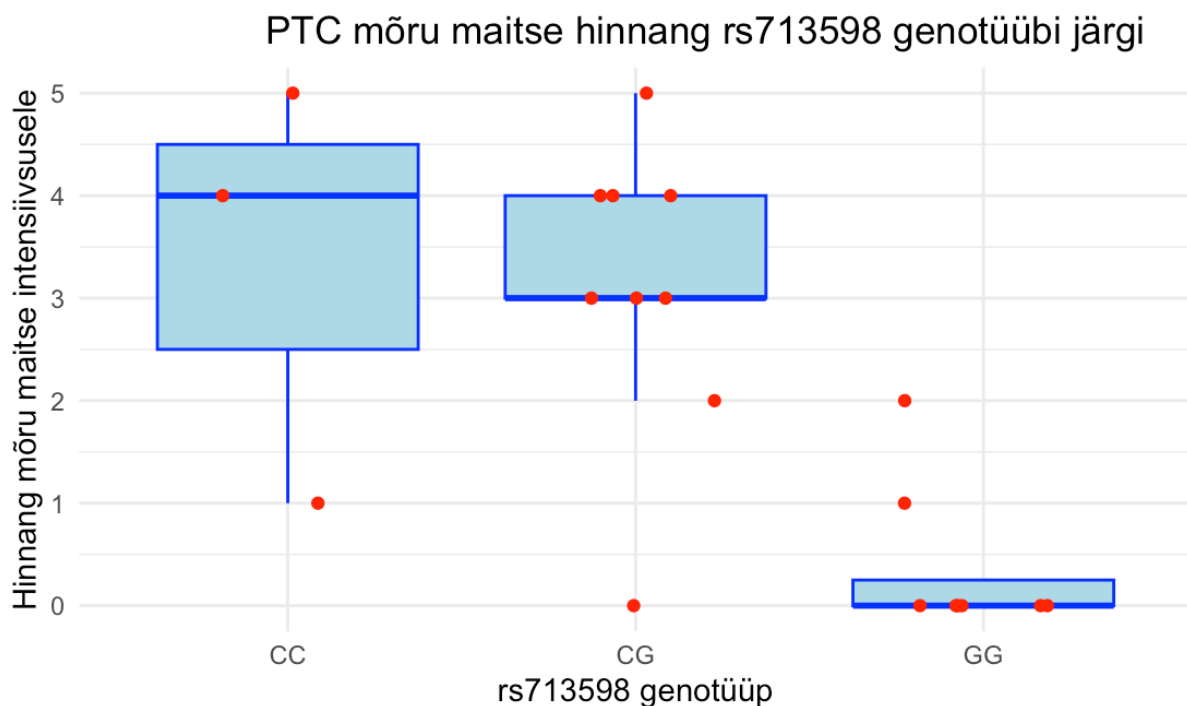


Joonis 7. Sangeri sekveneermise tulemused SNP rs10246939 kohta. A. C/C genotüübiga homosügoot, kes tunneb mõru maitset. B. C/T genotüübiga heterosügoot, kes tõenäoliselt tunneb mõru maitset. C. T/T genotüübiga homosügoot, kes ei tunne mõru maitset. Tulemuste visualiseerimiseks kasutati programmi SnapGene Viewer.

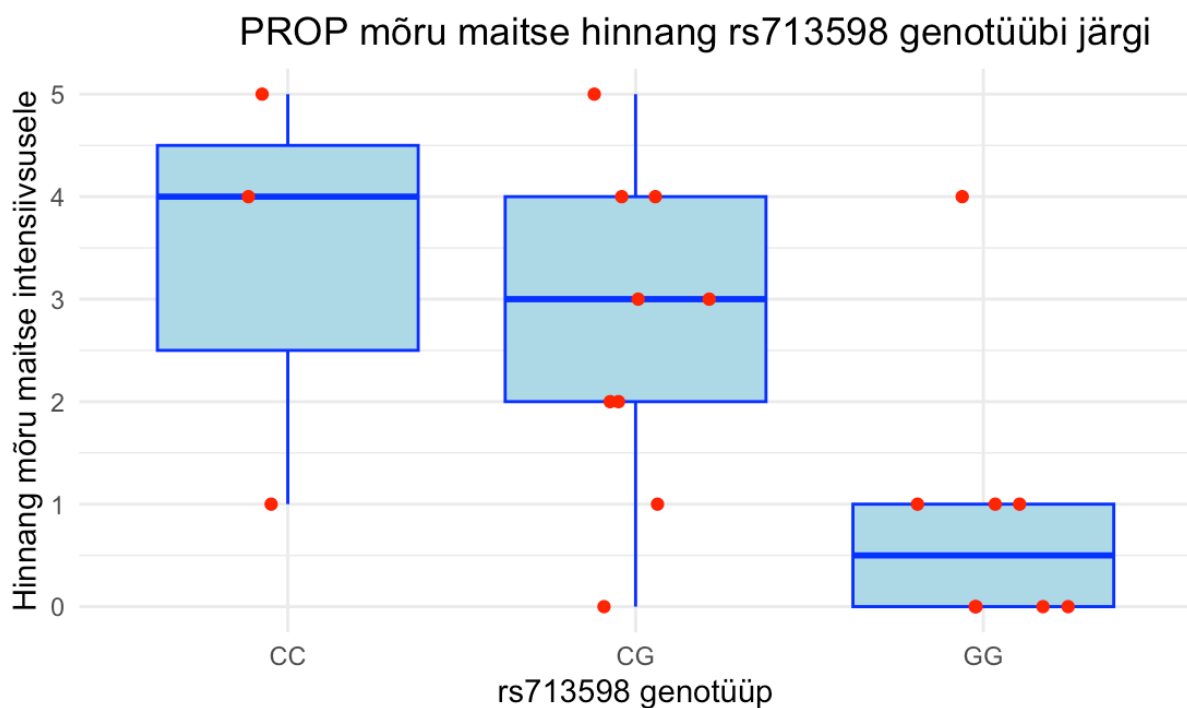
Tulemustest selgub, et kahekümnest vabatahtlikust indiviidist esines positsioonil 145 bp (rs713598) C/C genotüüp kolmel (15%) ja G/G genotüüp kaheksal (40%), ülejäänud uuritavad isikud olid C/G genotüübiga heterosügooidid (45%). Samuti nähtub tulemustest, et nii rs1726866 kui rs10246939 puhul oli mõru maitset tundvaid homosügoote 5 (25%), vastavalt G/G ja C/C, maitset mitte tundvaid homosügoote (vastavalt A/A ja T/T) oli mõlema SNP puhul 9 (45%) ning heterosügoote (vastavalt G/A ja C/T) oli 6 (30%).

Tulemustest ilmneb ka, et Hardy-Weinbergi seaduse järgi arvatult on rs713598 SNP-i puhul mõru maitset tundva alleeli C esinemissagedus 0,375 ja mõru maitset mitte tundva G alleeli esinemissagedus 0,625. SNP-ide rs1726866 ning rs10246939 puhul oli mõru maitset tundvate alleelide (vastavalt G ja C) esinemissagedus 0,4 ja seda mitte tundvate alleelide oma 0,6. NCBI andmebaasi ja UCSC *Genome Browser* järgi on 4480 eestlase hulgas rs713598 mõru maitse tundmise alleeli esinemissagedus 0,648, seega üle pooleteise korra suurem kui käesolevas uuringus. Selline erinevus võib olla tingitud antud uurimistöös kasutatud suhteliselt väikesest valimist. Samas nii rs1726866 kui rs10246939 puhul on NCBI ja UCSC *Genome Browser* andmetel eestlaste seas mõru maitse alleelide esinemissagedus 0,376, mis on samas suurusjärgus antud uuringu tulemustega, kus vastavad esinemissagedused on 0,4.

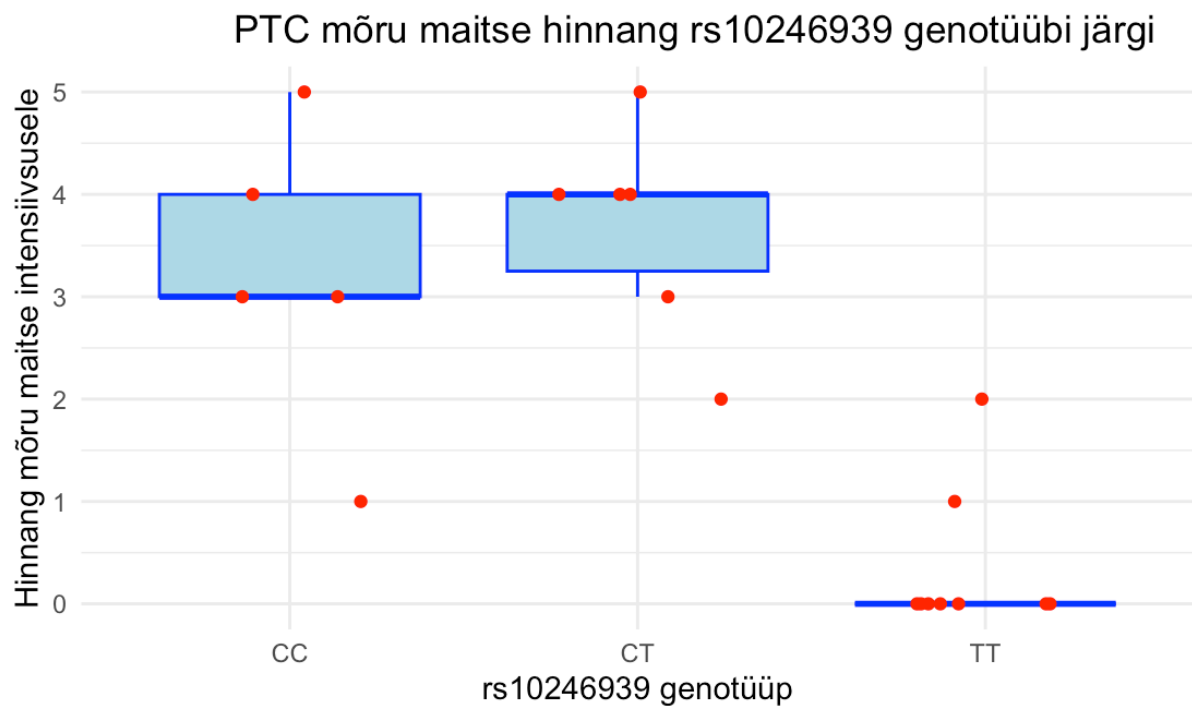
Joonistel 8-13 on kujutatud indiviidide maitsetundlikkuse hinnang PTC ja PROP-i suhtes Sangeri sekveneerimisel saadud TAS2R38 geeni kolme SNP-i genotüüpide järgi.



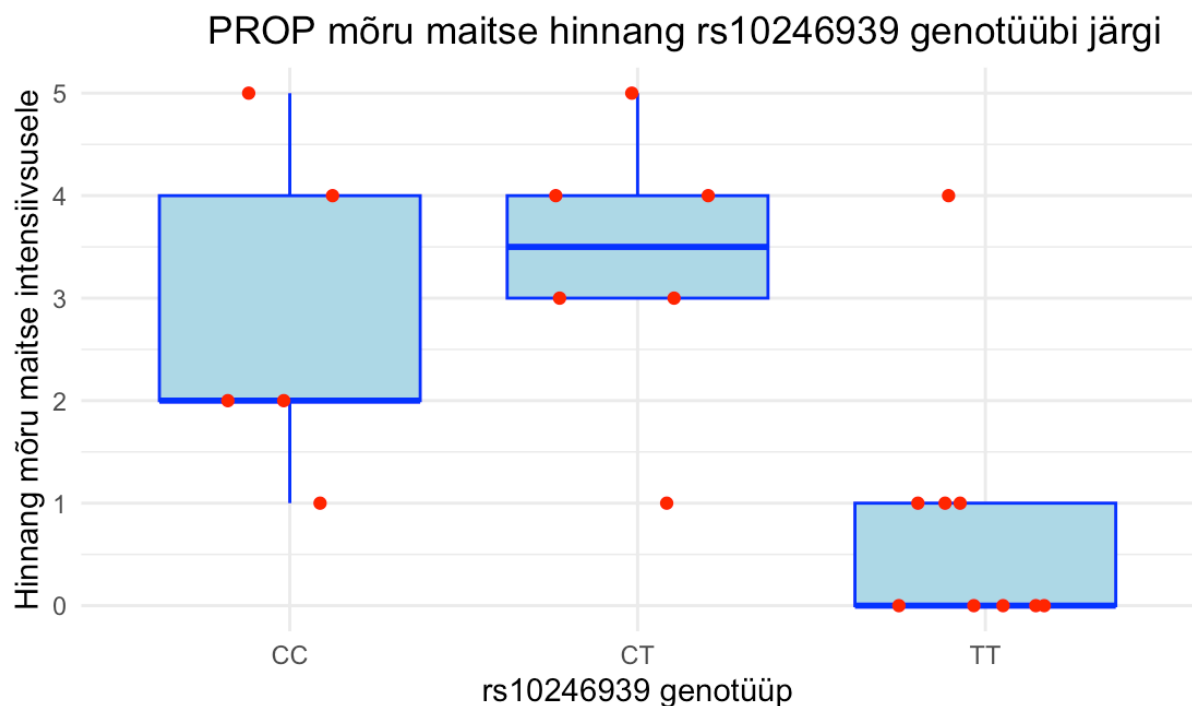
Joonis 8. PTC mõru maitse intensiivsuse hinnang rs713598 genotüüpidel. Punasega on tähistatud vabatahtlike indiviidide maitsetundlikkus vastavalt genotüübile. Joonis on loodud kasutades programmeerimiskeelt R ja tarkvaraprogrammi RStudio (pakett ggplot2).



Joonis 9. PROP mõru maitse intensiivsuse hinnang rs713598 genotüüpidel. Punasega on tähistatud vabatahtlike indiviidide maitsetundlikkus vastavalt genotüübile. Joonis on loodud kasutades programmeerimiskeelt R ja tarkvaraprogrammi RStudio (pakett ggplot2).



Joonis 12. PTC mõru maitse intensiivsuse hinnang rs10246939 genotüüpidel. Punasega on tähistatud vabatahtlike indiviidide maitsetundlikkus vastavalt genotüübile. Joonis on loodud kasutades programmeerimiskeelt R ja tarkvaraprogrammi RStudio (pakett ggplot2).



Joonis 13. PROP mõru maitse intensiivsuse hinnang rs10246939 genotüüpidel. Punasega on tähistatud vabatahtlike indiviidide maitsetundlikkus vastavalt genotüübile. Joonis on loodud kasutades programmeerimiskeelt R ja tarkvaraprogrammi RStudio (pakett ggplot2).

PTC ja PROP maitsetundlikkuse võrdlusest selgub, et mõlemate testribade puhul oli keskmine maitsetundlikkus skaalal nullist viieni 2,05. Tulemused on ootuspärased, sest uuringud on näidanud, et PROP-il ja PTC-l on peaaegu samad sensoorsed omadused (Genick jt, 2011).

Samas nähtub nii PTC kui PROP-i puhul, et maitsehinnangud ei lähe alati kokku genotüübiga ning kohati puudub korrelatsioon ka PTC ja PROP-i hinnangute vahel. Näiteks indiviid koodiga PTC_07 on kõikides uuritud SNP-i positsioonides mõru maitset mitte tundva genotüübiga ehk retsessiivne homosügoot, kuid hindas PROP-i testriba maitsmisel mõruduse intensiivsust numbriga 4, samas kui PTC intensiivsus oli 1. Vabatahtliku isiku koodiga PTC_16 puhul on kõikides uuritud positsioonides tegu heterosügootiga, mistõttu on oodatav, et ta tunneb mõrudust, kuid erinevus ilmneb PTC ja PROP-i maitseintensiivsustes, kus PTC-le antud hinnang oli 4, aga PROP-ile 1. Sellised tulemused võivad olla tingitud liiga lühikesest ajast testribade maitsmise vahel, kui eelmise ühendi maitse pole veel täielikult suust kadunud. Samuti võib tulemusi mõjutada enne testribade maitsmist tarbitud söök või jook ning psühholoogiline efekt, mille puhul inimene soovis tunda mõrudust ning hindas seda seetõttu tegelikkusest suurema intensiivsusega. Tulemuste täpsustamiseks võiks katset korrata samade indiviididega ning vaadelda, kas maitsmiste vahel ilmneb erinevusi.

Valimi suurendamine aitaks edaspidi kinnitada antud töös saadud tulemusi, täpsustada alleelisagedusi ning saada rohkem informatsiooni kolme mõru maitse tundlikkusega seotud SNP-i genotüüpide ja maitsetundlikkuse fenotüübiliste seoste kohta eestlaste hulgas. Kuna antud uuringus kattuvad üksiknukleotiidsete polümorfismide rs1726866 ja rs10246939 puhul vastavate genotüüpide esinemissagedused omavahel sajaprotsendiliselt, siis võib tulevikus kasutada maitsetundlikkuse genotüübi määramiseks vaid ühte neist SNP-dest. Lisaks Sangeri sekveneerimisele saaks genotüüpi määrata RFLP (restriktsiooni fragmendi pikkuse polümorfism, ingl *restriction fragment length polymorphism*) analüüsil kasutades näiteks restriktsiooniensüümi HaeIII rs713598 tuvastamiseks (CUNY Academic Works, BIO2450L Genetics Laboratory Manual), rs1726866 jaoks Fnu4HI (Reinking jt, 2013; Deshaware ja Singhal, 2017) ja TseI (New England Biolabs) ning rs10246939 genotüübi tuvastamiseks BccI (New England Biolabs) ja AatII (Deshaware ja Singhal, 2017).

KOKKUVÕTE

Bakalaureusetöö põhieesmärk oli välja töötada suljest eraldatava genoomse DNA põhine protokoll mõru maitse tundlikkusega seotud kolme üksiknukleotiidse polümorfismi (rs713598, rs1726866 ja rs10246939) tuvastamiseks inimese TAS2R38 geenis, mille põhjal oleks võimalik näitlikustada seoseid fenotüübiliste tunnuste ja DNA-s esinevate variatsioonide ehk genotüübi vahel, kombineerides PCR-i Sangeri sekveneerimisega. Lisaks oli töö eesmärgiks saada hinnang kolme mõru maitse tundlikkusega seotud SNP-i alleelisageduste, genotüüpide ja maitsetundlikkuse fenotüübiliste seoste kohta 20 vabatahtlikust indiviidist koosnevas valimis.

TAS2R38 on mõru maitse retseptori geen, mis mõjutab kui tugevalt tajub inimene näiteks toidus ning joogis mõru maitset. Täpsemalt määrab TAS2R38 seda, kas inimene tunneb fenüülitiokarbamiidi (PTC), 6-n-propüülitiouratsiili (PROP) ja nendega seotud ühendeid või mitte. Töö kirjanduse ülevaate osas kirjeldati inimeste maitseretseptoreid, TAS2R geeniperekonda ning TAS2R38 geeni koos uuritavate üksiknukleotiidsete polümorfismidega. Samuti anti ülevaade maailmas juba läbi viidud uuringute tulemustest, mis kujutasid mõru maitse tundmise alleeli esinemissagedust erinevates populatsioonides.

Bakalaureusetöö eksperimentaalses osas analüüsiti vabatahtlikelt indiviididelt kogutud genoomset DNA-d, et välja selgitada seoseid fenotüübiliste tunnuste, mis väljendusid mõru maitse tundmise intensiivsuses PTC ja PROP testribade maitsmisel, ja DNA-s esinevate variatsioonide ehk genotüübi vahel. Selleks disainiti praimerid, millega oli võimalik amplifitseerida TAS2R38 geeni kolme SNP-i (rs713598, rs1726866 ja rs10246939) ning mille sobivust testiti PCR-il. Genoomset DNA-d analüüsiti Sangeri sekveneerimise meetodil Genoomika Instituudi tuumiklaboris.

Selgus, et uuringus osalenud indiviidide genotüüpide seas oli mõru maitse tundlikkuse alleelide esinemissagedus rs713598 puhul 0,375 ning nii rs1726866 kui rs10246939 korral 0,4. Keskmise maitsetundlikkus nii PTC kui PROP testribade maitsmisel oli skaalal nullist viieni 2,05. Valimi suurendamine aitaks edaspidi kinnitada antud töös saadud tulemusi, täpsustada alleelisagedusi ning saada rohkem informatsiooni kolme mõru maitse tundlikkusega seotud SNP-i genotüüpide ja maitsetundlikkuse fenotüübiliste seoste kohta eestlaste hulgas. Veel võiks läbi viia testribade kordusmaitsmise, et kinnitada indiviidide hinnanguid mõruduse tundmisele. Lisaks on võimalik tulevikus katset korrata määrates genotüüpe RFLP analüüsil.

Polymorphisms associated with bitter taste sensitivity in the TAS2R38 gene

Agneta Uusküla

SUMMARY

There are five basic tastes: sweet, sour, salty, umami and bitter (Chaudhari ja Roper, 2010). One of the most studied taste components is bitterness, the perception of which often causes a negative reaction in humans. The evolutionary purpose of experiencing bitter taste has mainly been to protect humans from consuming potentially toxic substances and other compounds which are difficult to digest (Wang jt, 2022; Chaudhari ja Roper, 2010).

The products of the 25 different functional TAS2R genes in humans, regulate bitter taste perception and the most studied member of this gene family is TAS2R38 which directly affects how intensely people taste bitterness (Wang jt., 2022). Differences in the TAS2R38 gene also cause differences between people in the perception of bitter taste: some are very sensitive to it and cannot tolerate bitterness at all, while others are less sensitive or even completely insensitive (Boxer ja Garneau, 2015).

Bitterness, which is regulated by TAS2R38 gene, is one of the five basic tastes perceived by humans. The main goal of this thesis was to develop a protocol based on genomic DNA isolated from saliva for the detection of three single nucleotide polymorphisms (SNPs) (rs713598, rs1726866 and rs10246939) in the human TAS2R38 gene related to bitter taste sensitivity. Combining polymerase chain reaction (PCR) with Sanger sequencing it is possible to demonstrate the relationship between phenotypic traits and DNA variations, i.e. genotype. In addition, the aim of the work was to obtain an estimate of the allele frequencies, genotypes and phenotypic associations of three bitter taste sensitivity-related SNPs among 20 volunteers. For this purpose, information about their bitter taste sensitivity was collected from volunteers involved in the study, and the genotype related to taste sensitivity was determined based on the DNA isolated from the saliva at the location of the corresponding SNP.

The results of the experiments revealed that among the genotypes of the individuals participating in the study, the frequency of bitter taste sensitivity alleles was 0,375 for SNP rs713598 and 0,4 for both rs1726866 and rs10246939 SNPs. The average taste sensitivity when tasting both the PTC and PROP test strips was 2,05 on a scale of zero to five. In the future, increasing the sample would help to confirm the results obtained in this work, to specify the allele frequencies and to get more information about the three SNP genotypes related to bitter

taste sensitivity and the phenotypic associations of taste sensitivity among Estonians. Re-tasting of the test strips could also be carried out to confirm individuals' ratings of the intensity of bitterness. In addition, it is possible to repeat the experiment in the future by determining the genotypes by RFLP analysis.

TÄNUSÕNAD

Soovin tänada kõiki, kes aitasid kaasa minu lõputöö edukale valmimisele, eelkõige juhendajaid Tõnis Orgu ja Ants Kurge, kelle põhjalik tagasiside ja pidev toetus aitas väga kaasa lõputöö kirjutamisele. Veel tahaksin tänada biotehnoloogia õppetooli laboranti Merle Külaotsa, kelle laiad teadmised erinevatest töövõtetest ning positiivne ja hooliv suhtumine oli abiks minu bakalaureusetöö eksperimentaalse osa läbiviimisel.

KIRJANDUSE LOETELU

Adler, E., Hoon, M. A., Mueller, K. L., Chandrashekar, J., Ryba, N. J. P. ja Zuker, C. S. (2000). A Novel Family of Mammalian Taste Receptors. *Cell*. 17.03.2000. 100(6), lk 693-702. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80705-9

Behrens, M., Gunn, H. C., Ramos, P. C. M., Meyerhof, W. ja Wooding, S. P. (2013). Genetic, Functional, and Phenotypic Diversity in TAS2R38-Mediated Bitter Taste Perception. *Chemical Senses*. 01.07.2013. 38 (6), lk 475-484. DOI: 10.1093/chemse/bjt016

Benish ja Choi J-H. (2023) Bitter Taste Receptor TAS2R38 Genetic Variation (rs10246939), Dietary Nutrient Intake, and Bio-Clinical Parameters in Koreans. *Clinical Nutrition Research*. Jaanuar 2023. 12(1), lk 40-53. DOI: 10.7762/cnr.2023.12.1.40

Boxer, E. E. ja Garneau, N. L. (2015). Rare haplotypes of the gene TAS2R38 confer bitter taste sensitivity in humans. *SpringerPlus*. Detsember 2015. 4(1), lk 505. DOI: 10.1186/s40064-015-1277-z

Chandrashekar, J., Hoon, M. A., Ryba, N. J. P. ja Zuker, C. S. (2006). The receptors and cells for mammalian taste. *Nature*. November 2006. 444(7117), lk 288-294. DOI: 10.1038/nature05401

Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Hoon, M. A., Adler, E., Feng, L., Guo, W., Zuker, C. S. ja Ryba, N. J. P. (2000). T2Rs Function as Bitter Taste Receptors. *Cell*. 17.03.2000. 100(6), lk 703-711. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80706-0

Chaudhari, N. ja Roper, S. D. (2010). The cell biology of taste. *Journal of Cell Biology*. 09.08.2010. 190(3), lk 285-296. DOI: 10.1083/jcb.201003144

Colares-Bento, F. C., Souza, V. C., Toledo, J. O., Moraes, C. F., Alho, C. S., Lima, R. M., Cordova, C. ja Toledo Nobrega, O. (2012). Implication of the G145C polymorphism (rs713598) of the TAS2r38 gene on food consumption by Brazilian older women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. 01.03.2012. 54(2), lk 13-18. DOI: 10.1016/j.archger.2011.05.019

Deshaware, S. ja Singhal, R. (2017). Genetic variation in bitter taste receptor gene *TAS2R38*, PROP taster status and their association with body mass index and food preferences in Indian population. *Gene*. 05.09.2017. 627, lk 363-368. DOI: 10.1016/j.gene.2017.06.047

- Drayna, D. (2005). HUMAN TASTE GENETICS. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 22.09.2005. 6(6), lk 217-235. DOI: 10.1146/annurev.genom.6.080604.162340
- Feeney, E., O'Brien, S., Scannell, A., Markey, A., ja Gibney, E. R. (2011). Genetic variation in taste perception: does it have a role in healthy eating? Proceedings of the Nutrition Society. Veebruar 2011. 70(1), lk 135-143. DOI: 10.1017/S0029665110003976
- Genick, U. K., Kutalik, Z., Ledda, M., ... le Coutre, J. (2011). Sensitivity of Genome-Wide-Association Signals to Phenotyping Strategy: The PROP-TAS2R38 Taste Association as a Benchmark. PLOS ONE. 23.11.2011. 6(11), lk e27745. DOI: 10.1371/journal.pone.0027745
- Keller, M., Liu, X., Wohland, T., Rohde, K., Gast, M.-T., Stumvoll, M., Kovacs, P., Tönjes, A. ja Böttcher, Y. (2013) *TAS2R38* and Its Influence on Smoking Behavior and Glucose Homeostasis in the German Sorbs. PLoS ONE. 02.12.2023. 8(12), lk e80512. DOI: 10.1371/journal.pone.0080512
- Kim, U., Jorgenson, E., Coon, H., Leppert, M., Risch, N., Drayna, D. (2003). Positional Cloning of the Human Quantitative Trait Locus Underlying Taste Sensitivity to Phenylthiocarbamide. Science. 21.02.2003. 299(5610), lk 1221-1225. DOI: 10.1126/science.1080190
- LaBronte, M. L. ja Beers, M. A. (2015). An alternative laboratory designed to address ethical concerns associated with traditional TAS2R38 student genotyping. Biochemistry and Molecular Biology Education. 20.02.2015. 43(2), lk 100-109. DOI: 10.1002/bmb.20846
- Reinking, J. L., Waldo, J. T. ja Dinsmore, J.(2013). A trio of human molecular genetics PCR assays. Biochemistry and Molecular Biology Education. 16.04.2013. 41(3), lk 173-179. DOI: 10.1002/bmb.20683
- Risso, D. S., Kozlitina, J., Sainz, E., Gutierrez, J., Wooding, S., Getachew, B., Luiselli, D., Berg, C. J. ja Drayna, D. (2016). Genetic Variation in the TAS2R38 Bitter Taste Receptor and Smoking Behaviors. PLoS ONE. 06.10.2016. 11(10), lk e0164157. DOI: 10.1371/journal.pone.0164157
- Shaji, C. S. ja Saraswathy, R. (2023). Taste receptors influencing effective modalities in human health – A cutting edge update on TAS1R and TAS2R receptor polymorphisms in taste perception and disease risk. Nutrition and Health. 10.07.2023. 0(0), lk 2601060231186865. DOI: 10.1177/02601060231186865

Shi, P., Zhang, J., Yang, H. ja Zhang, Y-p. (2003). Adaptive Diversification of Bitter Taste Receptor Genes in Mammalian Evolution. *Molecular Biology and Evolution*. 01.05.2003. 20(5), lk 805-814. DOI: 10.1093/molbev/msg083

Tepper, B. J., Banni, S., Melis, M., Crnjar, R. ja Tomassini Barbarossa, I. (2014) Genetic Sensitivity to the Bitter Taste of 6-*n*-Propylthiouracil (PROP) and Its Association with Physiological Mechanisms Controlling Body Mass Index (BMI). *Nutrients* 27.08.2014. 6(9), lk 3363-3381. DOI: 10.3390/nu6093363

Wang, X., Wang, L., Xia, M., Teng, F., Chen, X., Huang, R., Zhou, J., Xiao, J. ja Zhai L. (2022). Variations in the TAS2R38 gene among college students in Hubei. *Hereditas*. 19.12.2022. 159(1), lk 1-10. DOI: 10.1186/s41065-022-00260-x

Wendell, S., Wang, X., Brown, M., Cooper, M. E., DeSensi, R. S., Weyant, R. J., Crout, R., McNeil, D. W. ja Marazita, M. L. (2010) Taste genes associated with dental caries. *Journal of Dental Research*. November 2010. 89(11), lk 1198-1202. DOI: 10.1177/0022034510381502

Wooding, S., Gunn, H., Ramos, P., Thalmann, S., Xing, C. ja Meyerhof, W. (2010). Genetics and Bitter Taste Responses to Goitrin, a Plant Toxin Found in Vegetables. *Chemical Senses*. 01.10.2010. 35(8), lk 685-692. DOI: 10.1093/chemse/bjq061

KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. City University of New York Academic Works, BIO2450L Genetics Laboratory Manual. lk 86-92 https://academicworks.cuny.edu/ny_oers/7/ (kasutatud 22.05.2024)
2. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (kasutatud 16.05.2024)
3. New England Biolabs <https://www.neb.com/en> (kasutatud 21.05.2024)
4. Primer3web, version 4.1.0 <https://primer3.ut.ee> (kasutatud 13.05.2024)
5. SNPedia <https://www.snpedia.com/index.php/SNPedia> (kasutatud 16.05.2024)
6. UCSC *Genome Browser* <https://genome.ucsc.edu/> (kasutatud 07.05.2024)

LIHTLITSENTS

Mina, Agneta Uusküla,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose “Mõru maitse tundlikkusega seotud polümorfismid TAS2R38 geenis”,

mille juhendajad on Tõnis Org ja Ants Kurg,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 4.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Agneta Uusküla

26.05.2024