



Kandidaatintutkielma

Makeareseptori ja proteiinit makeutusaineina

Essi Kivilahti

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

1. Keinotekoiset makeutusaineet yleisesti	1
2. Makeareseptorin rakenne ja toiminta	2
2.1. Rakenne	4
2.1.1. Venus flytrap -domeeni sisältää monipuolisen aktiivisen kohdan	5
2.1.2. Runsaskysteiininen ja transmembraaninen domeeni ovat olennainen osa reseptorin aktivaatiota	6
2.2. Makeareseptorin aktivaatio ja sen aikaansaama signalointiviestintä	7
3. Makeat proteiinit	10
3.1. Brazzein	12
3.2. Monelliini	12
3.3. Taumatiini	13
3.4. Mabinlin	14
3.5. Makua muuttavat proteiinit	15
3.5.1. Mirakuliini	15
3.5.2. Neoculin	16
4. Makeiden proteiinien toiminta makeareseptorissa	17
4.1. Makeiden proteiinien sitoutuminen makeareseptoriin	19
5. Makeat proteiinit – kehitys makeutusaineiksi	22
Kirjallisuusviitteet	24

Käytetyt lyhenteet

Aoc	active open-closed
Aoc_AB	aktiivinen muoto, jossa T1R2 auki ja T1R3 kiinni
Aoc_BA	aktiivinen muoto, jossa T1R2 kiinni ja T1R3 auki
CRD	cystein rich domein, runsaskysteiniininen domeeni
GPCR	G-proteiinikytkentäinen reseptori
GRAS	Generally Recognized As Safe,
mGluR	metabotrooppinen glutamaattireseptori
MNEI	monelliinin muoto, jossa alayksiköt kiinnitettyinä toisiinsa Gly-Phe –linkkerin välityksellä
NAS	neoculin acidic subunit, neoculinin hapan alayksikkö
NBS	neoculin basic subunit, neoculinin emäksinen alayksikkö
Roo	resting open-open, makeareseptorin
T1R	tyypin 1 makureseptori
T1R2	tyypin 1 makureseptori, jäsen 2
T1R3	tyypin 1 makureseptori, jäsen 3
T2R	tyypin 2 makureseptori
TM	transmembrane, kalvon läpäisevä
TMD	transmembraaninen domeeni, kalvon läpäisevä domeeni
VFD	Venus Flytrap -domeeni

1. Keinotekoiset makeutusaineet yleisesti

Makuaistin eli gustatorisen aistin fysiologinen tehtävä on antaa informaatiota ravinnon laadusta jo ennen sen nauttimista, ja auttaa välttämään karvaalta maistuvia, mahdollisesti haitallisia tai myrkyllisiä aineita. Viidestä perusmausta makea on yksi tärkeimmistä ravinnon valintaan vaikuttavista tekijöistä. Yleisen käsityksen mukaan mieltymys makeaan on kehittynyt alun perin tunnistamaan runsasenergisistä ja ravinteikkaita ruoka-aineita, jonka vuoksi makean aistimista pidetään yleisesti ottaen miellyttävänä kokemuksena eläimillä ja ihmisillä. Kuitenkin, hunajaa lukuun ottamatta, runsassokeriset elintarvikkeet ovat ilmestyneet ihmisten ruokavalioon verrattain hiljattain. Nykypäivänä sokeria tuotetaan suuria määriä elintarviketeollisuuden käyttöön pääasiassa sokeriruo'osta ja -juurikkaista, ja makeuttamiseksi on kehitetty myös keinotekoisia makeutusaineita. Valkoisen sokerin tuominen jokapäiväiseen ruokavalioon onkin tuonut mukanaan myös epätoivottuja terveysvaikutuksia, kuten ylipainon ja metabolisen oireyhtymän yleistymisen kansallisella tasolla (Reed & McDaniel, 2006).

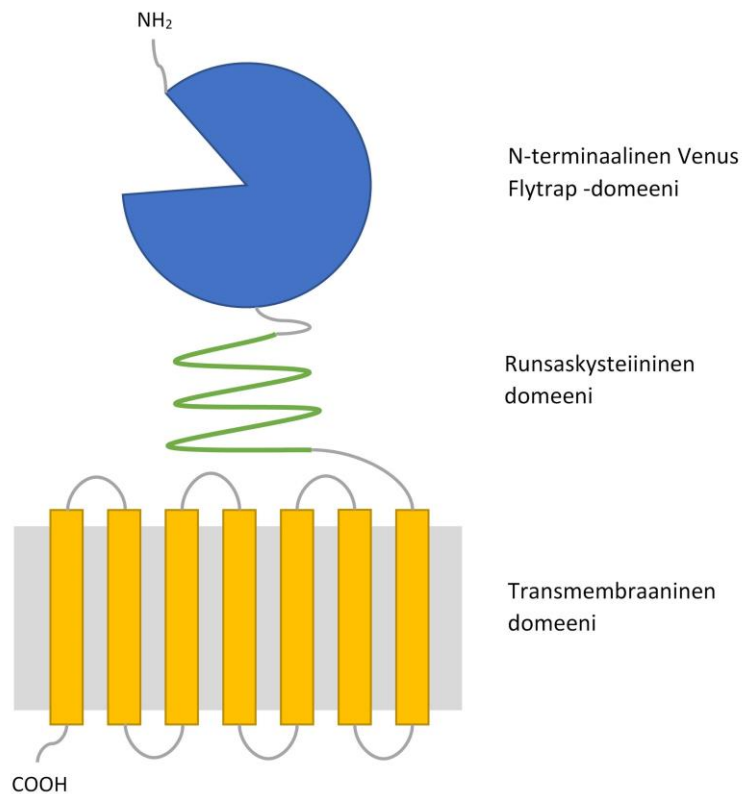
Keinotekoiset makeutusaineet ovat pienimolekyylisiä, vähäkalorisia tai kalorittomia aineita, jotka ovat nykypäivänä yleisimpiä ruoan lisäaineita. 1800-luvun lopulla löydettiin ensimmäinen keinotekoinen makeutusaine sakariini. Sitä käytettiin alun perin makeuttamaan diabetesta sairastavien henkilöiden ruokia, mutta se saavutti laajemman asiakaskunnan suosion toisen maailmansodan aikana sokerin saatavuuden heikettyä. Keinotekoisien makeutusaineiden käyttö kasvoi huomattavasti kuitenkin vasta 1900-luvun loppupuolella uusien makeutusaineiden kuten aspartaamin, asesulfaami-K:n ja sakkaroosin löytämisten myötä (Sylvetsky & Rother, 2016). Keinotekoisien makeutusaineiden suosion kasvua selittää niiden edullisuus sekä vähäkalorisuus, jonka vuoksi niiden on ajateltu edesauttavan painonpudotusta. Niiden käyttö elintarvikkeissa kuten vähäkalorisissa virvoitusjuomissa, viljatuotteissa ja sokerittomissa herkuissa onkin lisääntynyt. Makeutusaineita lisätään nykypäivänä elintarvikkeiden lisäksi myös lääkkeisiin, vitamiinivalmisteisiin ja hygieniatuotteisiin, kuten hammastahnaan (Sylvetsky & Rother, 2016). Keinotekoisien makeutusaineiden on kuitenkin todettu aiheuttavan monenlaisia haittavaikutuksia. Viime aikoina on tutkittu erityisen paljon niiden vaikutusta esimerkiksi glukoosi-intoleranssin (Kuk & Brown, 2016), metabolisen oireyhtymän, diabeteksen ja syövän syntyyn (Andreatta *et al.*, 2008), ja niiden on todettu vaikuttavan myös ruoansulatuskanavan bakteerikantaan. (Suez *et al.*, 2014)

Koska yhä useampien makeutusaineiden käyttö on liitetty sairauksiin kuten diabetekseen, on nykyään tunnetuille pienimolekyylisille makeutusaineille kehiteltävä muita vaihtoehtoja. Jo 70-luvulla löydettyistä makeista proteiineista voisi olla seuraavaksi suureksi trendiksi elintarviketeollisuudessa, ihmisten suosiossa yhä luonnollisempia elintarvikkeita. Proteiinien käyttö makeutusaineina avaisi uusia mahdollisuuksia elintarviketeollisuudessa, proteiineja koodaavia geenejä voitaisiin esimerkiksi lisätä jo viljakasvien genomiin, tuottaen ”luontaisesti” makeita geenimuunneltuja viljoja. Tässä tutkielmassa käyn lävitse yleisesti makeareseptorin rakenteen ja toiminnan, esittelen tähän mennessä löydetyt makeat proteiinit ja mitä niiden toimintamekanismista makeareseptorissa tiedetään. Lopuksi kerron vielä, miten luonnossa esiintyviä makeita proteiineja on kehitelty paremmin elintarviketeollisuuden käyttöön soveltuviksi, jotta niitä voitaisiin käyttää makeutusaineena tulevaisuudessa.

2. Makeareseptorin rakenne ja toiminta

Makujen aistiminen perustuu viiden eri perusmaun erottamiseen niiden molekyyli­rakenteiden perusteella. Näistä perusmauista makean, karvaan ja umamin, eli lihaisan tai maukkaan, maun perustana on molekyylin sitoutuminen makusilmun solukalvolla sijaitsevaan reseptoriin. Suolaisen ja happaman aistimus syntyy sen sijaan alkalimetallien kuten natriumin, tai protonien kulkeutuessa makusilmujen solujen sisään. Selkärankaisilla makean ja umamin maun välittäjänä toimivat tyypin 1 makureseptorit (eng. taste receptor type 1, T1R). Tähän reseptoriperheeseen kuuluu kolme reseptoria, joista heterodimeeriset makea- ja umamireseptori muodostuvat. Sekä makea- että umamireseptorissa toisena monomeerinä toimii T1R3-proteiini (taste receptor type 1 member 3), makeareseptorissa toisen monomeerin ollessa T1R2, ja umamireseptorissa T1R1. T1R-proteiinit ovat kaikki G-proteiinikytkentäisiä reseptoreja (eng. G protein-coupled receptor, GPCR), jotka muodostavat eukaryooteilla suurimman ja monipuolisimman kalvolla sijaitsevien reseptorien perheen. Ne ovat soluviestinnän olennainen osa monissa eri fysiologisissa prosesseissa kuten eri aisteissa ja immuunipuolustuksessa. G-proteiinikytkentäisten reseptorien perhe voidaan jakaa viiteen ryhmään sekvenssihomologian ja reseptorin toiminnan perusteella. Tyypin 1 makureseptorit kuuluvat G-proteiinikytkentäisten reseptorien ryhmään C (GRAFS luokittelussa glutamaattireseptorien ryhmä). Luokan C reseptorien rakenteesta, joka on esitetty­nä kaavakuvassa 1, löytyy suuri solun ulkopuolinen ”Venus Flytrap” -domeeni, joka sisältää sitoutumiskohdan reseptorin ligandeille. Reseptori on kiinnittynyt solukalvoon seitsemän kalvonläpäisevän α -kierteen avulla, ja nämä domeenit yhdistää runsaasti kysteiniä sisältävä

domeeni. Tähän samaan ryhmään kuuluu muun muassa joukko metabotropisia glutamaattireseptoreita, GABA-reseptoreita ja ”calcium sensing” -reseptori CasR. (Fredriksson *et al.*, 2003).



Kuva 1. Kaavakuva ryhmän C G-proteiinikytkentäisten reseptorien jäsenten rakenteesta.

Tyyppin 1 makureseptoreita koodaavia geenejä on kolme, joista jokainen koodaa omaa T1R-reseptoriperheen proteiinia. Hiirillä ja rotilla *Tas1r* (taste receptor, type 1) -geenit ovat sijoittuneet kromosomi 4:n päähän ja ihmisillä *TAS1R* geenit sijaitsevat vastaavasti kromosomi 1:n lyhyemmän käsivarren päässä. Ihmisillä *TAS1R*-geneissa on huomattu esiintyvän poikkeuksellisen paljon yhden nukleotidin polymorfismeja (eng single-nucleotide polymorphism, SNP), ja eri populaatioiden välillä olevan suurta vaihtelua polymorfismien määrässä ja sijainnissa. Erityisen paljon vaihtelua huomattiin *TAS1R2* geenissä, jonka koodaama proteiini vastaa suuressa osin makeiden molekyylien tunnistuksesta reseptorissa. Nämä polymorfismit voisivat olla yksi, miksi jotkin henkilöt ovat herkempiä makeille yhdisteille kuin toiset. (Choi *et al.*, 2016). Muutokset makeareseptoria koodaavissa geneissa on myös hiljattain yhdistetty tietynlaisten ruoka-aineiden suosimiseen ruokavaliassa tupakoinnin ohella, nostaten riskiä sairastua mahasyöpään (Choi *et al.*, 2016).

Tyypin 1 makureseptorit, joista makeareseptorikin muodostuu, löydettiin vasta 2000-luvun alussa, vaikka makean aistimista oli tutkittu jo pitkään. Jo vuonna 1974 Fuller osoitti, että erot makeutusaine sakariinin suosimisessa kahden hiirilinjan välillä johtuivat yksittäisestä lokuksesta *Sac* (Fuller, 1974). Myöhemmissä tutkimuksissa osoitettiin, että *Sac*-genotyyppi vaikutti myös muiden makeiden aineiden vasteeseen kieli-kitahermossa, vihjaten sen olevan olennainen osa makuärsykkeeseen syntymisessä ääreishermostossa, ja koodaavan mahdollisesti makeareseptoria. Uusia harppauksia makeareseptorin tunnistamiseksi tehtiin vasta 90-luvun loppupuolella, kun makusilmujen solujen ilmentämiä geenejä tutkittiin cDNA-geenikirjaston avulla. Analysoinnin tuloksena löydettiin kolme uutta G-proteiinikytkentäistä makureseptoria T1R1, T1R2 ja T1R3, joista viimeisen osoitettiin useissa tutkimuksissa vastaavan aiemmin tunnistettua *Sac*-lokusta. Zuker tutkimusryhmineen onnistui ensimmäisenä osoittamaan nisäkkäillä esiintyvän makeareseptorin olevan T1R2- ja T1R3-monomeereistä muodostuva heterodimeeri *Cell*-lehdessä vuonna 2001 (Nelson *et al.*, 2001), ja vuotta myöhemmin vastaava rakenne tunnistettiin myös ihmisestä (X. Li *et al.*, 2002)

Makeareseptorit löydettiin ensin kielen makusilmuista, tutkittaessa mitkä reseptorit tunnistavat makeita molekyylejä saaden aikaan makean aistimuksen (Nelson *et al.*, 2001). Yhä useammat tutkimukset ovat osoittaneet makeareseptorien ekspressoituvan makusilmujen lisäksi myös muissa kehon osissa ja elimissä, kuten ruoansulatuskanavassa (Dyer *et al.*, 2005), aivoissa (Ren *et al.*, 2009) ja sydämessä (Foster *et al.*, 2013). Ruoansulatuskanavassa makeareseptorit ovat liittyneet glukoosin aistimiseen, glukoositransportterien ekspressointiin ja glukoosihomeostasian ylläpitoon. Monissa muissa elimissä makeareseptorien merkitys on kuitenkin vielä tuntematon (Laffitte *et al.*, 2014).

2.1. Rakenne

Makeareseptori on heterodimeeri, joka muodostuu tyypin 1 makureseptoreista 2 ja 3 (T1R2-T1R3), joilla on molemmilla oma roolinsa makeareseptorin toiminnassa. Makeareseptorin tarkkaa kiderakennetta ei ole vielä saatu ratkaistua, sillä kalvoproteiinina sen kiteytys on vielä haastavaa. Rakennetta on sen sijaan tutkittu erilaisin molekyylihallinnusmenetelmin. Viimeisin laskennallinen malli makeareseptorin kolmiulotteiselle rakenteelle luotiin hiljattain selvitettyjen mGluR-proteiinien rakenteiden (Doré *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014) avulla, jotka kuuluvat samaan reseptoriperheeseen makeareseptorin monomeerin kanssa. mGluR1 ja mGluR5 -proteiinien kiderakenteiden avulla saatiin ensimmäistä kertaa luotua laskennalliset mallit myös solukalvon läpäiseville domeeneille, jonka avulla makeareseptorin toimintaa

voidaan jatkossa tutkia tarkemmin. Rakenteen tarkentamiseksi laskennalliseen malliin yhdistettiin myös tietoa useista makeareseptorin kohdennettuja mutageneesejä (*eng. site-directed mutagenesis*) hyödyntävistä tutkimuksista, kooten dataa noin 600:sta yksittäisestä mutaatiosta. Tässä kappaleessa makeareseptorin kolmiulotteisesta rakenteesta puhuttaessa viitataan tähän uusimpaan laskennalliseen rakenteeseen. (Chéron *et al.*, 2017).

2.1.1. Venus flytrap -domeeni sisältää monipuolisen aktiivisen kohdan

Makeareseptorin Venus Flytrap -domeenin (VFD) voidaan ajatella olevan heterodimeeri, jonka monomeerit koostuvat kahdesta kolmen liitoksen avulla toisiinsa liittyneestä 250 aminohapon kokoisesta lohkoista. Nimensä domeeni on saanut kärpäsloukkukasvin mukaan, sillä se pystyy kasvin kidan tavoin lohkojen konformaatiota muuttamalla sulkeutumaan ligandin ympärille, sulkien sen sisäänsä. Makeareseptorin VF-domeenia on tutkittu mGluR1-proteiinin kiderakenteen perusteella luodun tietokonemallinnuksen avulla. mGluR1:n rakenteessa lohkojen rakenne muodostuu β -levystä, jonka molemmilla puolilla on α -kierteitä. Lohkojen rakenteen voidaan olettaa olevan hyvin samankaltainen myös muilla saman reseptoriperheen reseptoreilla, sekvenssihomologian tyyppin 1 makureseptorien ja mGluR:n välillä ollen 29 %, sekä T1R2 ja T1R3 välillä 39 %. (Chéron *et al.*, 2017)

mGluR1:n solun ulkopuolisen osan tiedetään esiintyvän kolmessa muodossa; ligandiin liittyneenä, sekä kahdessa ligandiin sitoutumattomassa, ns. vapaassa muodossa, joiden välillä reseptori vaihtelee konformaatiotaan, kun ligandia ei ole tarjolla (Kunishima *et al.*, 2000). Vapaassa muodossa I molemmat VFD:t ovat avoinna (*eng. resting open-open*, Roo), ja vapaassa muodossa II VFT-domeeneista toinen on avoinna ja toinen kiinni (*eng. active open-closed*, Aoc), joka on konformaatioiltaan lähes identtinen ligandiin liittyneen muodon kanssa. Muotojen välistä tasapainoa voidaan siirtää kohti aktiivista muotoa liittämällä reseptorin sitoutumiskohtaan pienimolekyylinen yhdiste, mGluR1:n tapauksessa glutamaattimolekyyli, jolloin reseptori omaksuu aktiivisen muodon (Kunishima *et al.*, 2000). Makea- ja mGluR1-reseptorien välisen korkean homologian vuoksi myös T1R2-T1R3-reseptorin VFD:n uskotaan esiintyvän näissä konformaatioissa.

Makeareseptorin pääasiallinen pieniä substraatteja sitova osa löytyy T1R2 ja T1R3 reseptoreista niiden VFD:en lohkojen välisestä tilasta. mGluR:n tavoin domeenin avoimessa muodossa lohkojen väliin muodostuu kiilamainen vako, johon ligandit voivat sitoutua ja suljetussa muodossa lohkot sulkeutuvat ligandin ympärille. VFD vaihtelee konformaatiotaan näiden kahden muodon välillä, ja ligandin sitoutuminen stabiloi domeenin suljettua muotoa

(Morini *et al.*, 2005). Molekyylihallinnuksella luodussa mallissa avoimessa konformaatioissa reseptorin aktiivinen kohta on kooltaan noin 4900 Å³, mahdollistaen sekä suurien että pienien molekyylien sitoutumisen. Aktiivinen kohta on sekä T1R2- että T1R3-reseptoreissa pinta-alaltaan noin 50 % hydrofiilinen, ollen siten saatavilla polaarille molekyyleille kuten sokereille ja pienille makeutusaineille. Kokeellisesta rakennemallista löytyy myös pääasialliseen aktiivisen kohdan viereinen toinen sitoutumiskohta. Se muistuttaa rakenteeltaan myös mGluR4 -reseptorista löydettyä sekundääristä aktiivista kohtaa, ja sisältää T1R2 -reseptorissa S40 -aminohappotähteen jonka on huomattu vaikuttavan aspartaamin sitoutumiseen makeareseptoriin. Tätä uutta sitoutumiskohtaa voitaisiin mahdollisesti hyödyntää uusia makeutusaineita suunniteltaessa (Chéron *et al.*, 2017).

Sekä T1R2 että T1R3 sisältävät aktiivisen kohdan VFD:n lohkojen välisessä tilassa. Useimmat tunnetut makeat yhdisteet ja keinotekoiset makeutusaineet sitoutuvat heterodimeerissä kuitenkin T1R2:n VFD:in, jossa niiden sitoutumiskohdat sijaitsevat samassa tilassa VFD:n lohkojen välissä, mutta jokaisella on oma spesifi sitoutumispaikkansa (K. Masuda *et al.*, 2012). Esimerkiksi aspartaami, D-tryptofaani ja sukraloosi sitoutuvat osittain samoihin aminohappotähteisiin; lohkoissa 1 Y103 ja D142, sekä lohkoissa 2 D278, E302, ja D307, mutta vaativat sen lisäksi sitoutumisen omaan spesifimpään aminohappotähteeseensä, esimerkiksi aspartaamilla sitoutumisen tähteeseen S144. Taas esimerkiksi sakkariinin tai asesulfaami K:n sitoutumisessa välttämättömiä ovat eri aminohappotähteet (K. Masuda *et al.*, 2012). T1R3:n VFD:n rooli makeiden yhdisteiden tunnistamisessa ei ole niin merkittävä, sillä T1R3 esiintyy myös umamireseptorissa. Sen sisältää kuitenkin reseptorien homologian johdosta hyvin samankaltaisen aktiivisen kohdan kuin T1R2, jonka on todettu pystyvän sitoutumaan ainakin trehaloosiin (Ariyasu *et al.*, 2003), sekä hiirikokeissa reagoimaan monomeerina myös luonnossa esiintyvien sokerien, kuten sakkaroosin ja glukoosin hyvin korkeisiin pitoisuuksiin. (Zhao *et al.*, 2003).

2.1.2. Runsaskysteiininen ja transmembraaninen domeeni ovat olennainen osa reseptorin aktivaatiota

Runsaskysteiininen domeeni (*eng.* cystein rich domain, CRD) yhdistää substraatin tunnistavan VFD:n solukalvolla vasteen aikaansaavaan transmembraaniseen domeeniin (TMD). CRD sisältää muiden ryhmän C GPCR-proteiinien tavoin yhdeksän hyvin konservoitunutta kysteiinitähdettä, joita apuna käyttäen domeenin laskennalliset rakenteet on useimmiten luotu. Kysteiinitähteistä kahdeksan muodostaa neljä domeeninsisäistä

rikkisidosta, ja yhdeksäs muodostaa rikkisidoksen VFD:n kysteiniin kanssa (Kunishima *et al.*, 2000). Näiden rikkisidosten ajatellaan suosivan VFD:n ja TMD:n välistä kytkentää proteiinin aktivoituessa. Homologiamallissa CRD:sta löytyy rikkisidosten rajoittaman rakenteen lisäksi domeenin lopusta lyhyt rakenteeton *random coil* -alue. Tämä mahdollistaa muuten rikkisidoksien johdosta jäykän rakenteen muodonmuutoksen VFD:n ja TMD:n kytkennässä. Joustava alue sijaitsee lähellä TMD:n solunulkoista silmukkaa 2 (*eng.* transmembrane loop 2), ja voisi siten myös interaktoida TMD:n kanssa proteiinin aktivoituessa (Chéron *et al.*, 2017). Runsaskysteiniinisen domeenin ei tiedetä sisältävän sitoutumiskohtia ligandeille, ja sen jäykän ja hyvin konservoituneen rakenteen johdosta se tuskin interakttoi suoraan ligandien kanssa.

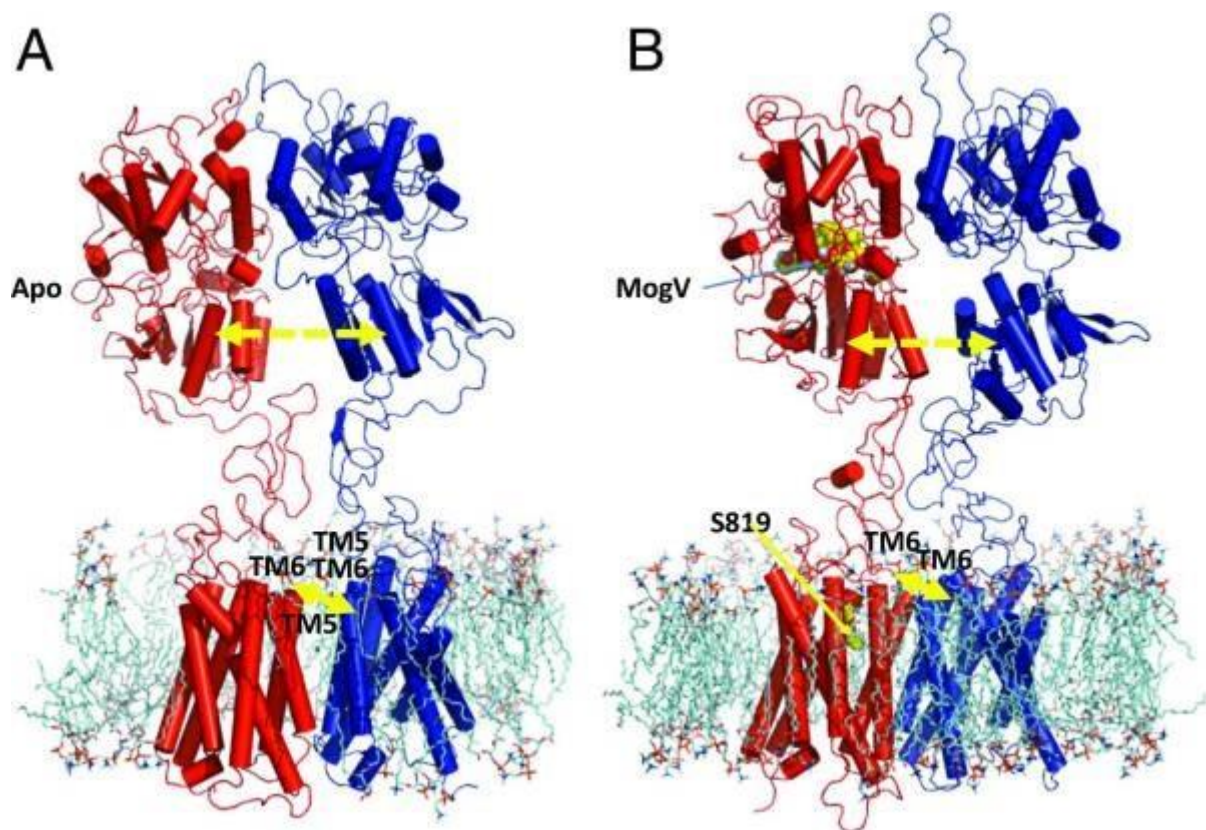
T1R2- ja T1R3 -reseptorien TMD:t koostuvat seitsemästä kalvon läpäisevästä α -kierteestä. Muiden luokan C reseptorien tavoin TMD:stä löytyy allosteerinen sitoutumiskohta, johon voi liittyä sekä allosteerisia aktivaattoreita, että estäjiä (K. Masuda *et al.*, 2012). mGluR5:n osalta on myös osoitettu, että TMD pystyy myös toimimaan luokan A G-kytkentäisten reseptorien tavoin, jos siihen ei ole liittyneenä solun ulkopuolisia domeeneja, toimien reseptorissa sekundäärisenä sitoutumiskohtana. (Goudett *et al.*, 2004). TMD:istä T1R3:sta on enemmän kokeellista dataa kohdennetuista mutageneeseistä, joten sen rakennekin pystytään ennustamaan tarkemmin. Mallissa aktiivista kohtaa ympäröivät kalvon läpäisevät α -kierteet 3, 5 ja 6, sekä ekstrasellulaarinen silmukka 2 (*eng.* extracellular loop 2), ja suuremman ligandin liittyessä aktiivinen kohta pystyisi mahdollisesti laajenemaan myös kierteisiin 2, 4 ja 7. Kooltaan T1R3:n TMD:n aktiivinen kohta on mallissa 270 \AA^3 , johon T1R3:n ligandit syklamaatti ja laktisoli mahtuvat hyvin sitoutumaan. T1R2:n TMD pystyy myös sitomaan pieniä synteettisiä ligandeja, kuten perillartinea ja P4000:a. Aktiivinen kohta on T1R3:n vastaavaa pienempi, noin 210 \AA^3 , ja niiden rakenteissa on huomattavia eroa, joka selittää miksi T1R3:n ligandit eivät pysty sitoutumaan T1R2:en (Chéron *et al.*, 2017).

2.2. Makeareseptorin aktivaatio ja sen aikaansaama signalointiviestintä

Tyypin 1 makureseptorien rakenteiden ollessa vielä kokeellisesti ratkaisematta, on makeareseptorin tarkan toimintamekanisminkin tutkiminen hyvin haastavaa. Viimeisin tutkimus T1R2-T1R3-reseptorin aktivaatiomekanismista on vuodelta 2017, jossa tutkimuksia tehtiin ensimmäistä kertaa molekyyylimallinnuksen avulla ryhmän luomalla makeareseptorimallilla, joka sisälsi kaikki reseptoriheterodimeerin domeenit (Kim *et al.*, 2017). G-proteiinikytkentäisten reseptorien toiminta perustuu reseptorin aktivaatiosta seuraavaan G-proteiinin irtoamiseen reseptorista solukalvon intrasellulaarisella puolella, joka

aikaansa tiettyjen signalointiteiden aktivoitumisen (Huang & Tesmer, 2011). Makeareseptorin kohdalla mielenkiintoista on, että ligandin liittyminen T1R2:n VFD:in, saa useimmiten G-proteiinin irtoamaan T1R3:n TMD:sta. (Kim *et al.*, 2017).

Mallinnuskokeessa toimintamekanismiksi ehdotettiin pääpiirteissään seuraavaa: ligandin sitoutuessa VFD2:en (T1R2:n VFD) signaali kulkeutuu VFD3:n kautta CRD3:een, ja lopuksi TMD3:en, jossa se saa aikaan G-proteiinin aktivaation. Mekanismi on hyvin samankaltainen aiemmin tietokonemallinnuksin tutkitun mGluR2-homodimeerin aktivaatiomekanismin kanssa. Ligandin sitoutuminen VFD2:een saa aikaan VFD:n stabiloitumisen suljettuun muotoon, ja VFD3:n liikkumisen VFD2:a kohti noin 6 Å verran. Tämä T1R3:n VFD:n konformaation muutos saa aikaan muutoksia myös CRD3:ssa, joka yksi tärkeimmistä kohdista signaalin kuljetuksessa makureseptorin aktivaatiossa. Mutaatiot tässä domeenissa voivat joissain tapauksissa poistaa täysin makureseptorin toimintakyvyn, kun taas mutaatioilla T1R2:n CRD:ssä ei sen sijaan ole yhtä merkittävää roolia. (Kim *et al.*, 2017)

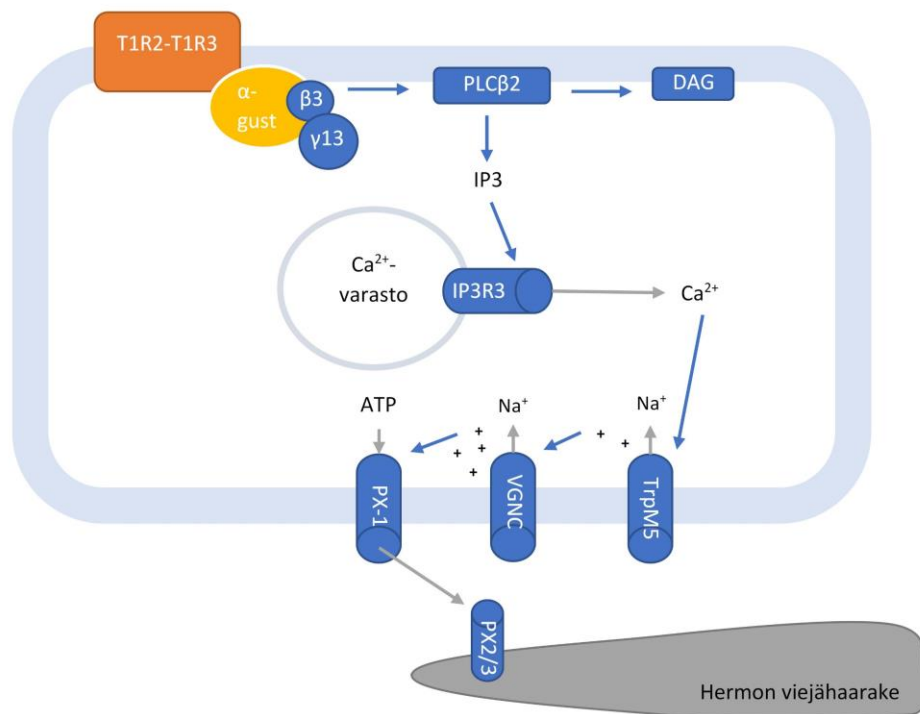


Kuva 2. Näkymä makeareseptorin rakenteesta sivusta päin kuvattuna, jossa T1R2 punaisella ja T1R3 sinisellä. Rakenteessa (A) reseptori on ilman ligandia. Rakenteessa (B) reseptoridimeerin T1R2:n VFD on sitoutuneena MogV-makeuttajaan (mogroside V), joka näkyy keltaisella, sekä T1R2:n TMD:ssä vihreään S819-makeuttajaan (1-((1H-pyrrol-2-yl)methyl)-3-(4-isopropoxyphenyl)thiourea). Keltaiset nuolet osoittavat reseptorien VFD:en ja kalvon läpäisevien kierteiden 5 ja 6 liikettä toisiaan kohti aktivaation johdosta. (Kim *et al.*, 2017)

CRD3:sta signaali kulkeutuu seuraavaksi TMD3:n yläosaan. Reseptoridimeerin ollessa ”lepotilassa”, monomeerien TMD:en välillä interaktoivat kalvon läpäisevät (*eng.* transmembrane, TM) kierteet 4 ja 5, muodostaen TM45/TM45 -yhteyden. Aktiivisessa muodossa TMD-dimeerissä on sen sijaan TM56/TM56 -yhteys, joka aktivoitumisen seurauksena muuttuu TM6/TM6 -yhteydeksi. CRD3:sta saapuva signaali vaikuttaa TMD:ssä erityisesti TM6:een, saaden aikaan TM6/TM6 -yhteyden syntymisen. Tämä erottaa T1R3:n TMD:n solunsisäisellä puolella TM3:n ja TM6:n toisistaan, luoden makeareseptorille spesifille G-proteiinille tilaa sitoutua reseptoriin. Makeareseptorissa aktivaation myötä tapahtuvat konformaation muutokset on esitetty kuvassa 2. Kiderakenteita, joissa TMD:in olisi liittyneenä G-proteiini, ei ole vielä saatu selvitettyä, joten varsinaiset interaktiot makeareseptorin ja G-proteiinin välillä ovat vielä hämärän peitossa. Ei siis vielä tiedetä, miten G-proteiini aktivoituu makeareseptorin toimesta, aloittaen solunsisäisen viestintäketjun.

Makusilmut ovat useista solutyypeistä muodostuvia sipulin muotoisia solurykelmiä, joita esiintyy suuontelossa ja nielun limakalvolla. Makusilmujen tyveen on liittyneenä hermosoluja, jotka välittävät viestin makuaistimuksesta aivokuorelle. Jokaisessa makusilmussa esiintyy tukisolujen lisäksi kolmenlaisia aistinsoluja, joista tyyppin II solut omaavat karvaan, umamin ja makean aistimisesta vastaavia tyyppin 1 ja 2 makureseptoreja (Roper & Chaudhari, 2017). Sekä T1R että T2R:n aktivoituminen aikaansaa samankaltaisten solunsisäisten viestinvälitysmekanismien aktivoitumisen, jonka vuoksi niitä karvas-, umami- ja makeareseptoreita ekspressoidaan makusilmuissa pääasiassa eri soluissa (Zhang *et al.*, 2003). Makureseptorin aktivaatiosta seuraava pääasiallinen signalointireitti tyyppin II aistinsolussa on esitettyä kuvassa 3.

Yleisin makeareseptorin aktivoima G-proteiini koostuu $G\alpha_{\text{gus}}$ -alaysiköstä (tunnetaan myös nimellä gustducin) ja siihen liittyneistä $G\beta 3$ - ja $G\gamma 13$ -alaysiköstä. Pääasiallisessa signalointireitissä $G\beta 3\gamma 13$ -kompleksi aktivoi fosfolipaasi $C\beta 2$:n, joka puolestaan hajottaa kalvolle sitoutuneen fosfatidyli-inositoli-4,5-bisfosfaatin (PIP2) liukoiseksi inositoli-4,5-trisfosfaatiksi (IP3) ja solukalvolle jääväksi 1,2-diasyyliglyseroliksi (DAG). IP3 sitoutuu tyyppin III IP3-reseptoriin, joka saa aikaan kalsiumionien vapautumisen intrasellulaarisista varastoista. Kalsiumin vapautuminen sytoplasmaan saa aikaan solukalvolla sijaitsevan TrpM5-proteiinin aktivoitumisen. TrpM5 saa aikaan solukalvon polarisoitumisen vapauttamalla solukalvon lävitse tarpeeksi natriumioneja, jotta jänniteohjatut (voltage-gated) natriumkanavat aukeavat polarisoiden solukalvoa entisestään. Solukalvon polarisoituminen saa aikaan ATP:n vapautumisen pannexin-1-hemikanavan kautta synapsirakoon, jossa se liittyy afferentin hermon purinergiseen reseptoriin (Kinnamon, 2012).



Kuva 3. Kaaviokuva makeareseptorin aktivoimasta signalointireitistä tyypin II aistinsolussa makusilmussa. T1R2-T1R3-reseptorin aktivoitumisen seurauksena Gβγ-kompleksi aktivoi fosfolipaasi C:n, IP3:n konsentraatio solussa kasvaa ja kalsiumioneja vapautetaan solun varastoista. Vapautunut Ca²⁺ aktivoi TrpM5:n, joka depolarisoi solukalvoa vapauttamalla natriumioneja solun sisään, jonka seurauksena jänniteohjatut Na⁺-kanavat aktivoituvat. Sen seurauksena solukalvo depolarisoituu lisää, ja pannexin-1 kanavat aukeavat ja vapauttavat solusta ATP:ta synapsirakoon.

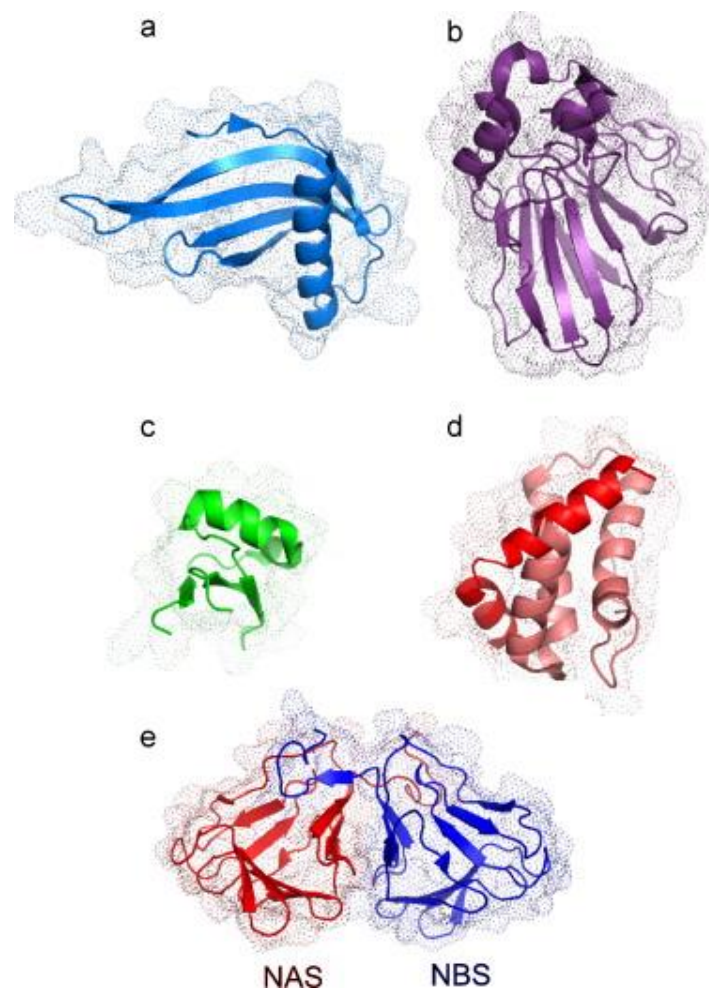
3. Makeat proteiinit

Makeat proteiinit muodostavat erikoisen ryhmän proteiineja, sillä niillä ei ole makean maun aikaansaamisen lisäksi juurikaan muuta yhteistä rakenteen tai sekvenssin puolesta. Kaikki tunnetut makeat proteiinit on löydetty Afrikan ja Malesian alueilla esiintyvistä trooppisista kasveista. Nämä kasvit eivät ole sukua toisilleen, poissulkien brazzeinia ja mabinlinia tuottavat kasvit jotka ovat etäistä sukua sillä ne kuuluvat samaan kasvien lahkoon. Samoilla Afrikan ja Malesian alueilla on tapahtunut myös kädellisten kehitystä, ja jotkin tutkimukset ovat ehdottaneet makeiden proteiinien maistuvan makealle ainoastaan kädellisiin kuuluvilla eläimillä. (Picone & Temussi, 2012)

Makeat proteiinit ovat keskenään hyvin eri kokoisia eikä niillä ole juurikaan sekvenssihomologiaa. Niiden kolmiulotteiset rakenteet eivät myöskään muistuta toisiaan, tosin kaikista makeista proteiineista, poislukien mabinlin, löytyy sekundäärirakenteista sekä α-kierteitä että β-laskoksia, kuten kuvasta 4 voidaan nähdä. Tietyt hedelmien siemenissä

esiintyvät proteiinit omaavat samankaltaisuuksia makeiden proteiinien kanssa. Nämä samankaltaiset proteiinit ovat pääasiassa proteaasi- ja entsyymi-inhibiittoreita joiden tehtävä on vastata patogeenien ja tuholaisten hyökkäykseen. Makeiden proteiinien kehittyminen näistä siemenproteiineista voisi liittyä kasvin siemenien levityksen edistämiseen, hyödyttäen sekä itse kasvia että niitä syöviä kädellisiä.

Makeat proteiinit voidaan luokitella niiden ominaisuuksien perusteella intensiivisen makeisiin proteiineihin ja makua muuttaviin proteiineihin. Ensimmäiseen ryhmään kuuluvat monelliini, taumatiini ja brazzein, jotka ovat malliesimerkkejä makeista proteiineista. Ryhmään voidaan luokitella myös mabinlin, joka on muihin verrattuna kuitenkin huomattavasti vähemmän makea. Näiden lisäksi makeista proteiineista puhuttaessa puhutaan myös makua muuttavista proteiineista. Tarkkaan ottaen makua muuttavat proteiinit eivät kuulu makeisiin proteiineihin, sillä ne eivät itsessään aikaansaa makeaa aistimusta, vaan muuttavat happaman aistimuksen makeaksi. Tähän ryhmään kuuluvat mirakuliini ja neoculin (Picone & Temussi, 2012).



Kuva 4. Makeiden proteiinien rakenteita. (a) Yksiketjuinen monelliini (PDB ID: 1fa3). (b) Taumatiini I (PDB ID: 3a17). (c) Brazzein (PDB ID: 2KGQ). (d) Mabinlin II (PDB ID: 2ds2). (e) Neoculin, jossa hapen alayksikko (NAS) punaisella, ja emäksinen alayksikkö (NBS) sinisellä (PDB ID: 2d04). Kuvan lähde: (Picone & Temussi, 2012). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

3.1. Brazzein

Brazzein löydettiin vuonna 1994 itäafrikkalaisesta *Pentadiplandra brazzeana* –kasvin marjojen hedelmälihasta. Brazzein on tähän mennessä löydetyistä makeista proteiineista kooltaan pienin, eikä yhtä makea kuin esimerkiksi taumatiini ja monelliini, sen ollessa 17 000 kertaa sakkaroosia makeampaa. Se koostuu yhdestä 54 aminohappoa pitkästä ketjusta. Brazzein on erityisen lämmönkestävä ja sen makeus säilyy jopa useiden tuntien 80-98 asteessa inkuboinnin jälkeen. Sen rakenne säilyy myös hyvin alhaisessa pH:ssa. Proteiinin stabiiliuden uskotaan johtuvan sen neljästä rikkisidoksesta ja vapaiden sulfhydryyliryhmien puutteesta (Ming & Hellekant, 1994).

Brazzeinin rakenne koostuu yhdestä α -kierteestä, sekä kolmesta β -laskoksesta muodostuvasta vastakkaisuuntaisesta β -levystä. Brazzeinin kahdeksan kysteiinitähdettä muodostavat neljä intramolekulaarista rikkisidosta. Ensimmäiset kaksi rikkisidosta liittävät α -kierteen β -levyn keskimmäiseen β -laskokseen kahdesta kohdasta. Kolmas rikkisidos sitoo proteiinin N- ja C-terminukset toisiinsa Cys4-Cys52 -sidoksella, ja viimeinen liittää proteiinista löytyvät *random coil* -rakenteen kolmanteen β -levyn β -laskokseen. Rikkisidosten stabiloima α - β -motiivi on samankaltainen kasvien defensiinien ja niveljalkaisista löytyvien toksiinien kanssa, ja rakenteensa perusteella brazzein voidaan luokitella kuuluvaksi proteiinien *scorpion toxin-like* superperheeseen (Caldwell *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2014).

Rakenteen stabiilius ja intensiivinen makeus tekevät brazzeinista lupaavan vaihtoehdon vähäkaloriseksi makeutusaineeksi. Sillä ei ole keinotekoisille makeutusaineille tyypillistä epämiellyttävää sivumakua, joskin se ei ole yhtä äkkimakeaa kuin esimerkiksi sakkaroosi (Hellekant & Danilova, 2005). Brazzein ei ole vielä saanut ns. GRAS (*Generally Recognized As Safe*) –statusta Yhdysvaltain elintarvike- ja lääkevirastolta, joten sitä ei ole tuotu vielä elintarvikemarkkinoille. Brazzeinin tuotantoa elintarviketeollisuuden käyttöön on kehitelty muun muassa Etelä-Koreassa, jossa sitä on tuotettu *Kluyveromyces lactis* -bakteerin avulla, jonka käyttö elintarviketeollisuudessa on saanut GRAS-statuksen. (Yun *et al.*, 2016)

3.2. Monelliini

Monelliini (*eng.* monellin) on 10.7 kDa kokoinen kahdesta alayksiköstä muodostuva heterodimeerinen proteiini. Se löydettiin vuonna 1969 Afrikan trooppisilla alueilla esiintyvän *Dioscoreophyllum cumminsii* –kasvin marjasta, sen ollen ensimmäinen löydetty makea proteiini (Inglett & May, 1969). Makeudeltaan monelliini on 100 000 kertaa makeampaa kuin sakkaroosi, ollen yksi makeimmista tunnetuista yhdisteistä. Monelliinin 44 ja 50

aminohappoa pitkät alayksiköt A ja B ovat liittyneet toisiinsa ei-kovalenttisilla sidoksilla, ja proteiinille ominainen makeus esiintyy vain alayksiköiden ollessa toisiinsa sitoutuneita (Bohak & Li, 1976).

Rakenteen perusteella monelliini on luokiteltu kuuluvaksi kystatiinien superperheeseen. Kystatiinin kaltainen tertiäärirakenne muodostuu viidestä β -laskoksesta muodostuvasta vastakkaissuuntaisesta β -levystä, jonka koveralla puolella sijaitsee yksi α -kierre. Se on sellaisenaan melko epästabiili, ja sen alayksiköt irtoavat toisistaan jo 50°C lämpötilassa. Stabiiliuden parantamiseksi monelliinista on kehitetty kaksi versiota; yhdestä polypeptidiketjusta muodostuva SCM (single-chain monellin) (Kim *et al.*, 1989) ja MNEI, jossa luonnollisen monelliinin A ja B ketjut ovat liitettynä toisiinsa C-terminuksesta N-terminukseen Gly-Phe –linkkerin välityksellä (Tancredi *et al.*, 1992). Erityisesti MNEI:tä on tutkittu sen stabiiliuden vuoksi paljon, ja siitä on luotu muun muassa hypermakeita versioita kohdennettua mutageneesiä käyttämällä (Liu *et al.*, 2016; T. Masuda *et al.*, 2016).

Luonnossa esiintyvä monelliini on helposti veteen liukeneva, mutta se denaturoituu helposti korkeammissa lämpötiloissa, jonka vuoksi se ei sovellu sellaisenaan prosessoituihin elintarvikkeisiin. Se, tai sen stabiilimmat johdannaiset eivät myöskään ole vielä saaneet hyväksyntää Yhdysvaltojen tai Euroopan terveys- ja hyvinvointiministeriöiltä elintarviketeollisuudessa käytettäväksi.

3.3. Taumatiini

Taumatiini (*eng.* thaumatin) on 207 aminohappoa pitkä monomeerinen proteiini. Se löydettiin Ghanan alueen sademetsissä esiintyvän *Thaumatococcus daniellii* –kasvin hedelmästä vuonna 1968, sen ollen yksi ensimmäisistä löydetyistä makeista proteiineista. Luonnossa sitä esiintyy viidessä muodossa, joista suurin osa on muotojen I ja II seoksena, ja lisäksi pienemmissä määrin muodoissa a, b ja c, joista muoto I on edustettuna kuvassa 4. Eri muodot eroavat toisistaan vain aminohapoissa 46, 63, 67, 76 ja 113, rakenteiden ollessa lähes identtisiä (T. Masuda *et al.*, 2011).

Taumatiinin rungon tärkein rakenne on 11 β -laskoksesta muodostuvasta litistynyt β -barrel -rakenne. Rakenteen kaikki β -laskokset ovat toisiinsa nähden vastakkaissuuntaisia C- ja N-terminaalien laskoksia lukuun ottamatta, ja ne ovat yhdistyneet toisiinsa käänösrakenteiden ja kahden rikkisidoksen avulla. Tähän β -barrel -rakenteeseen on liittyneenä lisäksi kaksi pientä kysteiinirikasta domeenia, jotka sisältävät yhteensä 6 rikkisidosta lisää (de Vos *et al.*, 1985). Taumatiini kuuluu sen mukaan nimettyyn taumatiinin kaltaisten proteiinien superperheeseen,

jonka muita jäseniä ovat esimerkiksi jotkin muista kasveista löydetty ksylynaasi-inhibiittorit (Vandermarliere *et al.*, 2010).

Taumatini on makeista proteiineista ainoa, jota on alettu käyttää elintarvikkeiden lisäaineena, se patentoitiin ja tuotiin markkinoille heti löytämisen jälkeen kauppanimellä Talin. Taumatini on hyvin veteen liukeneva, lämpöä ja pH:n muutoksia kestävä proteiini, joten se soveltuu hyvin elintarvikkeisiin käyttöön. Vaikka taumatini on maultaan hyvin makea, noin 100 000 kertaa sakkaroosia makeampi, sen makuprofiili ei kuitenkaan muistuta sokeria. Sen maku kehittyy hitaasti ja kestää pitkään jättäen lakritsimaisen jälkimaun suurina annoksina nautittuna (van der Wel & Loeve, 1972). Siksi sitä käytetään usein muiden makeutusaineiden kanssa peittämään niiden ei-haluttuja sivumakuja. Taumatini on sallittu lisäaineena muun muassa Euroopan unionissa (Scientific opinion on the safety of the extension of use of thaumatin (E 957).2015), sekä Israelissa ja Japanissa. Yhdysvalloissa se on saanut GRAS –statuksen elintarvikkeissa käytettäväksi makuaineeksi, mutta ei makeutusaineena (Flavor extract manufacturers association (FEMA).)

3.4. Mabinlin

Mabinlin poikkeaa aiemmin mainituista makeista proteiineista, sillä vaikka se on 375 kertaa sakkaroosia makeampaan, se ei yllä lähellekään taumatiniin, monelliiniin tai brazzeiniin makeuksia. Se löydettiin vuonna 1983 Kiinan subtrooppisilta alueilta esiintyvän *Capparis masaikai* -kasvin (toiselta nimeltään mabinlang) siemenistä, joita on jo pitkään käytetty osana perinteistä kiinalaista lääkintää. Mabinlinin esiintyy siemenissä muodoissa I, II, III ja IV, jotka ovat keskenään hyvin samanlaisia, eroten toisistaan vain muutaman aminohappotähteen kohdalla. Mabinlinin muotoa II on tutkittu eniten, sillä se löydettiin muodoista ensimmäisenä, ja se on hyvin termostabiili (Nirasawa *et al.*, 1994).

Mabinlin on kahdesta kovalenttisesti toisiinsa sitoutuneesta alayksiköstä koostuva proteiini. Muista makeista proteiineista mabinlin poikkeaa myös siinä, että se koostuu ainoastaan α -kierteistä. 33 aminohappoa pitkä A-ketju muodostuu kahdesta α -kierteestä jotka yhdistää vetysidoksilla liittynyt käänösrakenne, muodostaen niin sanotun *helix-turn-helix*-motiivin. 72 aminohappoa pitkä B-ketju sen sijaan muodostuu kolmesta α -kierteestä, joista kaksi muodostaa samanlaisen *helix-turn-helix*-motiivin kuin A-ketjussa, kolmannen liittyessä lyhyen lenkkirakenteen välityksellä kahteen muuhun. B-ketjusta löytyy sen lisäksi vielä kaksi alayksikön sisäistä rikkisidosta. A- ja B-ketju ovat liittyneet toisiinsa kahden rikkisidoksen välityksellä, tehden mabinlinin rakenteesta melko kompaktin (Li *et al.*, 2008).

Mabinlinin makua testattaessa huomattiin myös, että myös pelkkä B-ketju pystyy yksinään saamaan aikaan makean aistimuksen, A-ketjun ollessa sellaisenaan mauton. Mabinlinin natiivin muodon ja B-ketjun välinen ero niiden mauissa oli kuitenkin huomattava, molempien ollessa makeita, pelkän B-ketjun aikaansaama aistimus oli lyhytkestoinen, natiivin mabinlinin maistussa kielellä vielä puolen tunnin jälkeen nauttimisesta. (Li *et al.*, 2008)

3.5. Makua muuttavat proteiinit

Muita makean aistimiseen ja makureseptoreihin vaikuttavia proteiineja ovat mirakuliini ja neoculin. Ne eivät suoraan anna makean aistimusta, vaan ne saavat makeareseptorit aktivoitumaan niiden altistuessa proteiinin läsnäollessa happamille olosuhteille. Makua muuttavien proteiinien avulla voidaan näin ”huijata” makuaistia, ja saada esimerkiksi happamista elintarvikkeista kuten sitrushedelmistä esille uusia makuja, happamuuden aistimuksen poistuessa.

3.5.1. Mirakuliini

Mirakuliini poikkeaa aiemmin mainituista makeista proteiineista siinä, että se on itsessään mauton. Makean aistimus saadaan vasta happamia ruoka-aineita nautittua ja mirakuliinin vaikutus makuaistiin voi kestää jopa reilun tunnin ajan. Mirakuliini on peräisin länsiafrikkalaisesta *Synsepalum dulcificum* -kasvin marjoista. Marjat tunnetaan myös ihmemarjan (*eng.* miracle fruit) nimellä johtuen sen kyvystä muuttaa hapanta makeaksi, jonka mukaan proteiini on saanut nimensä. Afrikassa alkuperäisasukkaat käyttävät marjoja muun muassa makeuttamaan hapanta palmun maitiaisnesteestä tehtyä viiniä.

Mirakuliinia esiintyy 191 aminohappoa pitkistä alayksiköstä koostuvina homodimeerisinä ja -tetrameerisinä proteiineina. Sen monomeeri on mauton, mutta dimeeri ja tetrameeri aikaansaavat muutoksen makuaistissa. Mirakuliinidimeerissä sen monomeerit ovat liittyneet yhteen rikkisidosten välityksellä, tetrameerin muodostuessa kahdesta dimeeristä. Mirakuliinista löytyy myös kaksi N-linkitettyä oligosakkaridia per monomeeri. Mirakuliini kuuluu mirakuliinin kaltaisten proteiinien perheeseen, jonka jäsenet ovat kasveissa esiintyviä proteaasi-inhibiittoreita, kuten esimerkiksi soijapavun trypsiini-inhibiittori. Mirakuliinin tarkan kolmiulotteisen rakenteen ollessa vielä ratkaisematta, on muiden mirakuliinin kaltaisten proteiinien rakenteiden perusteella pystytty rakentamaan homologiaan perustuvia malleja. Mirakuliinin monomeerin rakenteessa esiintyy todennäköisesti Kunitz-inhibiittoreille

tyypillinen *β -trefoil* -laskos, joka muodostuu β -laskosten muodostamasta tynnyrirakenteesta, jossa on kolmikulmainen ”kansi” (Paladino *et al.*, 2008).

Mirakuliinin toiminnan mekanismi on pitkään ollut tuntematon. Uusimman teorian mukaan inaktiivinen mirakuliini sitoutuu neutraalissa pH:ssa makeareseptorin T1R2-proteiinin aminoterminaaliseen domeeniin solun ulkopuolella. pH:n laskiessa, sekä makeareseptori että mirakuliini protonoituvat, saaden aikaan makeareseptorin osittaisen aktivoitumisen. On huomattu, että heikot hapot kuten sitruunahappo saavat aikaiseksi huomattavasti suuremman vasteen makeareseptorissa, kuin esimerkiksi suolahappo. Näin on ehdotettu, että täydelliseen makeareseptorin aktivaatioon vaaditaan N-terminaalisen osan lisäksi myös makeareseptorin intrasellulaarisen osan protonaatio. Tämä on mahdollista, sillä heikko happo kykenee kulkemaan solukalvon lävitse ja protonoimaan siten reseptorin solunsisäisiä osia (Sanematsu *et al.*, 2016).

3.5.2. Neoculin

Neoculin on mirakuliinin tavoin makua muuttava proteiini, mutta se on myös itsessään hieman makea. Se löydettiin länsi-Malesiassa kasvavan kärsäliljoihin kuuluvan *Curculigo latifolia* hedelmästä. Alun perin kasvista löytyvä proteiini nimettiin kurkuliiniksi (*eng.* curculin), jolloin sen oletettiin esiintyvän homodimeerinä. Myöhemmin makeudesta vastaavan proteiinin todettiin olevan itseasiassa heterodimeeri, ja tämän muodon nimeksi annettiin neoculin. Neoculin koostuu kahdesta eri alayksiköstä. Ensimmäinen on 133 aminohappoa pitkä hapan, glykolysoitu alayksikkö (*eng.* neoculin acidic subunit, NAS). Toinen alayksikkö, jota pidettiin alun perin kurkuliinin ainoana alayksikkönä, on 114 aminohappoa pitkä ja emäksinen (*eng.* neoculin basic subunit, NBS). Alayksiköt ovat liittyneet toisiinsa kahden rikkisidoksen avulla (Shimizu-Ibuka *et al.*, 2006).

Neoculinin toimintamekanismista ei vielä tiedetä muuta kuin että se sitoutuu makeareseptorissa T1R3:n ekstrasellulaariseen domeeniin (A. Koizumi *et al.*, 2007). Viimeisimmät tutkimukset neoculinin toimintamekanismista ovat vuodelta 2015, jotka ehdottivat kahta eri toimintamekanismia. Koizumi työryhmineen (2015) tunnisti tutkimuksessaan neoculinin toiminnalle oleellisia aminohappotähteitä ja samassa tutkimuksessa he ehdottivat pH:n muutoksen vaikuttavan neoculinin ja reseptorin välisiin vetysidoksiin. Neutraalissa pH:ssa vetysidokset estävät reseptorin aktivaatiota, pH:n laskiessa reseptorin sitoutumiskohdan histidiinien protonaatio purkaa vetysidoksia, mahdollistaen makeareseptorin aktivaation neoculinin toimesta (T. Koizumi *et al.*, 2015). Ohkubon

työryhmä (2015) sen sijaan ehdotti neoculinin dimeerisen rakenteen hajoavan pH:n muutoksen johdosta monomeereiksi, ja sen mahdollistavan normaalisti monomeerien välissä olevien rakenteiden sitoutumisen makeareseptoriin aktivoiden sen (Ohkubo *et al.*, 2015).

Taulukko 1. Yhteenvedo makeiden proteiinien ominaisuuksista

Proteiini	Aminohapot	Rakenne	Kasvi	Suhteellinen makeus verrattuna sakkaroosiin (molaarinen)
Taumatiini	207	Monomeeri	<i>Thaumatococcus danielli</i> B.	100 000
Monellin	94	Heterodimeeri	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i> D.	100 000
Brazzein	54	Monomeeri	<i>Pentadiplandra brazzeana</i> B.	17 000
Mabinlin	105	Heterodimeeri	<i>Capparis masaikai</i> Levl.	375
Mirakuliini	191	Homodimeeri	<i>Synepalum dulcificum</i>	Ei makea
Neoculin	227	Heterodimeeri	<i>Curculigo latifolia</i>	?*

* neoculinin makeutta mittaavien tutkimuksien tulokset epäjohdonmukaisia eri tutkimuksissa. Lähde: Mukailtu lähteestä *Dissimilar sweet proteins from plants: Oddities or normal components?* (Picone, Temussi, 2012)

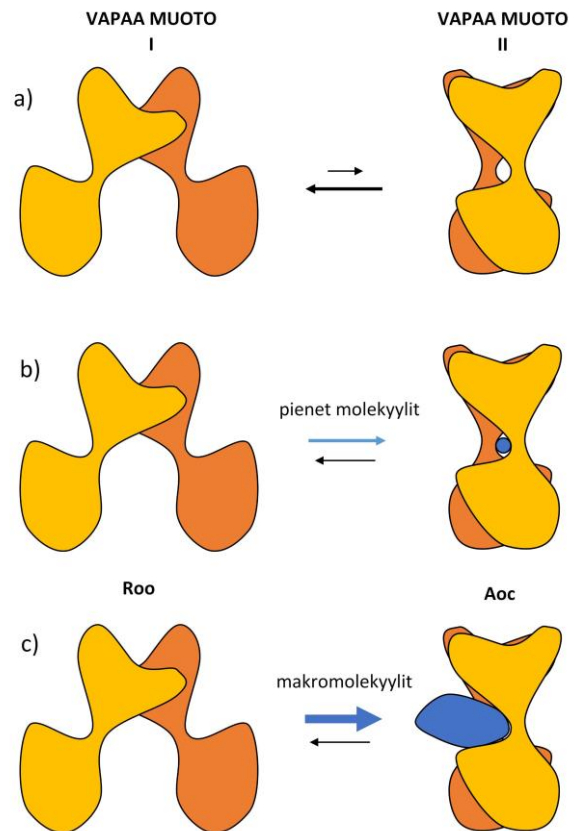
4. Makeiden proteiinien toiminta makeareseptorissa

Pienimolekyylisten makeutusaineiden toiminta makeareseptorissa käytiin läpi aiemmassa kappaleessa, jossa todettiin, että ne sitoutuvat pääasiassa makeareseptorin VFT-domeenin lohkojen välisestä tilasta löytyvään aktiiviseen alueeseen. Myös makeiden proteiinien ehdotettiin aluksi sitoutuvan samaan aktiiviseen kohtaan niin sanottujen ”sweet finger” -rakenteiden välityksellä. ”Sweet finger” -rakenteella tarkoitettiin sekä brazzeinille, monelliinille että taumatiinille yhteistä ulkonevaa β -loop -rakennetta, joka uskottiin muistuttavan kemiallisilta ominaisuuksiltaan muita pieniä makeuttajia, pystyen liittymään pienien makeuttajien aktiiviseen kohtaan VFD:ssa. Hypoteesi osoitettiin kuitenkin vääräksi, sillä tutkimalla ”sweet finger” rakenteita matkivien syklisten peptidien vaikutusta makeareseptoriin, niiden ei todettu aiheuttavan makean aistimusta. Tutkimuksen perusteella

todettiin, että makeiden proteiinien täytyy siten sitoutua makeareseptorilla eri aktiiviseen kohtaan kuin pienet makeuttajat (Tancredi *et al.*, 2004).

Edellä mainittu tutkimus vahvisti heti makeareseptorien löytämisen jälkeen Temussin (2002) ehdottaman, sittemmin kiilamalliksi (*eng.* wedge model) nimetyn hypoteesin pätevyyttä makeiden proteiinien toimintamekanismiksi makeareseptorissa. Hypoteesissaan Temussi vertasi makeareseptorin toimintamekanismia paremmin tunnettuun mGluR-proteiiniin, jonka tiedettiin muuttavan konformaatiotaan sekä spontaanisti että substraatin sitoutuessa kahden eri muodon välillä. Temussi ehdotti makeiden proteiinien toimintatavaksi niiden sitoutumista sekundääriseen aktiiviseen kohtaan makeareseptorilla, joka stabiloisi makeareseptorin aktiiviseen muotoon. Hypoteesinsa tueksi Temussi teki molekyylihallitusta brazzeinin, monelliinin ja taumatiinin telakoitumisesta rakentamaansa heterodimeerisen makeareseptorin rakenteeseen, joissa makeiden proteiinien todettiin sitoutuvan T1R3-monomeerin pinnalta löytyvään kuoppaan. Temussi totesi hypoteesissaan proteiinien sitoutumisen laajemmalle alueelle reseptorin pinnalla selittävän myös sen, miksi makeissa proteiineissa ei ole merkittävää rakennehomologiaa, ja miksi ne sitoutuvat reseptoriin paljon voimakkaammin, stabiloiden aktiivista muotoa tehokkaammin kuin pienimolekyyliset makeuttajat (Temussi, 2002).

Vuonna 2011 Temussi tutki kiilamallia tarkemmin, luomalla sille paljon yksityiskohtaisemman mallin kuin hypoteesia esittäessään. Mallin hän loi yhdistelemällä tutkimuksessaan rakenneanalytiikkaa, bioinformatiikkaa ja suurta määrää dataa kahden tutkituimman makean proteiinin, MNEI:n ja brazzeinin, kohdennetuista mutageneeseistä. Tutkimuksessa hän halusi selvittää voidaanko matalan resoluution telakointimenetelmillä tunnistaa reseptori-ligandi-komplekseja, jotka olisivat johdonmukaisia kohdennetuista mutageneeseistä saadun datan kanssa. Temussin mallin todettiin olevan johdonmukainen myös sellaisten monellinin ja brazzeinin kohdennettujen mutageneesien tuloksien kanssa, joiden dataa ei oltu käytetty mallin luomisessa. Mallin avulla pystyttiin muun muassa selittämään miten jotkin yllättävätkin mutaatiot vaikuttivat proteiinin makeuteen. Sen lisäksi Temussin luomaa mallia käytettiin myöhemmin muun muassa vielä makeamman MNEI-molekyylin luomisessa (Leone *et al.*, 2016), mikä sekin kertoo mallin olevan pätevä kuvaus makeiden proteiinien sitoutumisesta makeareseptoriin (Temussi, 2011).



Kuva 5. Kiilamalli. a) Esitys makeareseptoridimeerin konformaatioiden välisestä tasapainotilasta vapaiden muotojen I ja II välillä. Lepotilassa tasapainotila on siirtynyt suosimaan vapaata muotoa I. b) Esitys muotojen välisestä tasapainotilasta lepotilassa (*Roo*, *resting open-open*) olevan reseptorin ja aktiivisen konformaation (*Aoc*, *active open-closed*) välillä, jota pieni molekyyli (sinisen pallo) stabiloi. c) Esitys tasapainotilasta *Roo* ja *Aoc* –muotojen välillä, kun reseptoridimeerin pinnalle liittyy makea proteiini (sininen kiilamainen muoto). Muokailtu lähteestä *Dissimilar sweet proteins from plants: Oddities or normal components?* (Picone, Temussi, 2012)

4.1. Makeiden proteiinien sitoutuminen makeareseptoriin

Makeiden proteiinien telakoitumissimulaatioissa makeareseptorimallin pohjana käytettiin jo vumoneonna 2002 reseptorien välisen korkean homologian vuoksi mGluR1:n kiderakennetta. Kiilamallin tutkimiseksi täytyi ensin selvittää missä konformaatioissa makean proteiinin sitoutuminen makeareseptoriin oli mahdollista. Eri konformaatioissa olevan makeareseptorin homologisessa mallinnuksessa törmättiin mielenkiintoiseen ongelmaan: sekä T1R2 että T1R3:n sekvenssit tulisi kohdistaa yhteen ainoaan mGlutR-templaattiin, joka kaiken lisäksi esiintyi useissa eri konformaatioissa. Tutkittaessa kaikkia mahdollisia kombinaatioita, todettiin makeareseptorin esiintyvän makean proteiinin sitoutumisessa todennäköisimmin *Aoc_AB*-muodossa, eli aktiivisessa muodossa, jossa makean proteiinin sitoutumiskohta on pääasiassa avoimessa (B) konformaatioissa olevan T1R3-monomeerin pinnalla, T1R2:n ollessa suljetussa (A) konformaatioissa. Tässä muodossa monomeerien välistä reseptorin

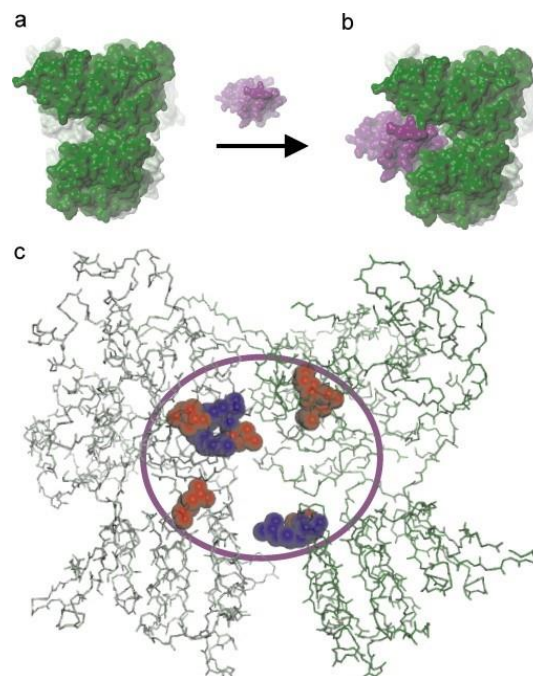
pinnalta löytyvä sitoutumisalue oli kaikista suurin, Aoc_BA-muodossa sitoutumiskohdan jakautuessa kahdeksi pienemmäksi kuopaksi. (Morini *et al.*, 2005).

Makeareseptorin pinnalta löytyvä sekundäärinen sitoutumiskohta makeille proteiineille on Aoc_AB-muotoisessa reseptorissa leveä, syvä, ja sisäänpäin kapeneva, komplementoiden makeista proteiineista löytyviä kartiomaisia muotoja. Pelkkä muotojen yhteensopivuus ei kuitenkaan riitä, vaan vielä tärkeämpää on proteiinin kärjen pinnan aminohappotähteiden ja reseptorin sitoutumispaikan elektrostaattisten ominaisuuksien yhteensopivuus. Makeareseptorin sitoutumiskohta proteiineille on pääasiassa varaukseltaan negatiivinen, joskin negatiivisesti varautuneet aminohappotähteet eivät ole jakautuneet sitoutumiskohdan pinnalle tasaisesti. Reseptorin kanssa interaktoidakseen proteiinin kärjestä täytyy siis löytyä epätasainen komplementoiva varaus (Temussi, 2011). Koska makeareseptorin tarkkaa rakennetta ei vielä tunneta, on molekyylihallinnoissa käytetty epätarkkaa, matalan resoluution telakoitumismenetelmää. Koska reseptorin malli on epätarkka, mallinnoissa proteiinit sitoutuivat reseptoriin useissa eri orientaatioissa, tai jopa eri kohtiin. Mallin tarkentamiseksi, tulisi joko makeareseptorin rakenne selvittää, tai telakoitumisessa käyttää hyväksi tietoa olennaisimmista makean proteiinin ja reseptorin välisistä interaktioista. Temussi käytti telakoitumismalleissaan hyväksi juuri näitä kohdennetuissa mutagenesikokeissa löydettyjä olennaisia aminohappotähteitä, etsiessään yhtä optimaalisinta proteiinin telakoitumistapaa reseptoriin.

MNEI:n telakoitumismallissa suurin osa MNEI:stä sijoittui reseptorin monomeerien välissä sijaitsevassa sitoutumiskuopassa T1R3:n puolelle. Reseptorin ja MNEI:n yksi yhteen sopivat aminohappotähteet ovat kuitenkin levittäytyneet sitoutumiskohdassa laajalle aluelle, ja sitoutumiskohtaan sijoittumisesta huolimatta sekä T1R3:ssa että T1R2:ssa on yhtä monta MNEI:n kanssa interaktiivaa aminohappotähdettä. Monomeerien ja MNEI:n väliset interaktiot eroavat hieman toisistaan ja voidaankin yleistää, että suurin osa reseptorin ja MNEI:n välisistä hydrofobisista interaktioista tapahtuu T1R3:n kanssa, kun taas proteiinin ja reseptorin väliset suolasillat sen sijaan ovat pääasiassa MNEI:n ja T1R2:n välillä. Brazzeinkin sitoutumismallissa brazzeinin suurin osa sitoutui enimmäkseen T1R3:n puolelle, mutta suurin osa varauksen omaavista aminohappotähteistä sen sijaan olivat yksi yhteen T1R2:sta löytyvien varauksien kanssa. Brazzeinissa sitoutumisen kannalta olennaiset aminohappotähteet ovat muodostaneet keskenään kolme eri kohdissa sijaitsevaa varauksellisten aminohappotähteiden rykelmää. Mielenkiintoisin löydös olikin, että pääasiassa T1R3:n kanssa interaktioivan joukon yksi aspartaattitähde interaktoikin T1R2:n kanssa, siten vahvistaen makeareseptorin monomeerien lukittautumista aktiiviseen

konformaatioon. MNEI:stä poiketen brazzeinin aminohappotähteet eivät muodosta sidoksia reseptorin vastakkaisten varauksien kanssa, vaan muodostavat lähinnä vetysidoksia neutraalien aminohappotähteiden, kuten glutamiinin ja seriinin kanssa.

Verrattaessa brazzeinin ja MNEI:n telakoitumista makeareseptorin sitoutumiskohtaan, voidaan todeta, että vaikka tavat joilla makeat proteiinit sitoutuvat reseptoriin eroavat toisistaan, niissä on myös paljon samankaltaisuuksia. Esimerkiksi vaikka brazzeinin, että MNEI:n sitoutumisessa vaikuttavista reseptorin aminohappotähteistä vain T1R2:n D456 on proteiineille yhteinen, ovat muut sitoutumisessa olennaiset aminohappotähteet sijoittuneet sitoutumiskohdassa toisiinsa nähden lähes täysin samoihin kohtiin. Myös sekä T1R2:sta että T1R3:sta löytyy brazzeinin ja MNEI:n sitoutumisessa olennaisia aminohappotähteitä lähes yhtä monta, joka selittää makeiden proteiinien kykyä ”lukita” makeareseptoridimeeri aktiiviseen konformaatioon. Temussin metodologia käytettiin myös myöhemmin taumatiinin telakoitumisen tutkimiseen, jossa todettiin taumatiinin ja reseptorin pinnan vastakkaisten varausten olevan ratkaisevia telakoitumisen kannalta. Mallia tutkittiin muun muassa muuttamalla taumatiinin reseptorin kanssa vaikuttavia positiivisesti varautuneita aminohappotähteitä neutraaleiksi, ja analysoiden niiden vaikutusta proteiinin makeuteen (T. Masuda *et al.*, 2016).



Kuva 6. Malli monelliinin sitoutumisesta makeareseptoriin (T1R2 vaaleanvihreä, T1R3 tummanvihreä). a) Makeareseptorin vapaa muoto II muuttuu monelliinin (violetti) liittymisen vaikutuksesta aktiiviseen muotoon Aoc (b). (c) Brazzeinin ja monelliinin kanssa interaktioivat reseptorin pinnalla sijaitsevat aminohappotähteet. Brazzeinin kanssa interaktioivat tähteet punaisella, monelliinin kanssa sinisellä. Makeiden proteiinien kanssa vuorovaikuttavat aminohappotähteet sijaitsevat kuvassa ympyröidyn alueen sisällä. Kuvan lähde: (Picone & Temussi, 2012). Kuvan käyttöön on saatu lupa kustantajalta.

5. Makeat proteiinit – kehitys makeutusaineiksi

Makeat proteiinit sopisivat monien ominaisuuksien puolesta elintarviketeollisuuden käyttöön makeutusaineena jo nyt, mutta proteiinitekniikan keinoin makeiden proteiinien eri ominaisuuksia voidaan kehittää yhä paremmin elintarvikkeisiin soveltuviksi. Makeutusaineeksi soveltumisessa olennaisin ominaisuus on luonnollisesti kyky aktivoida makeareseptoria, ja siten maistua makealle. Tutkimalla makeareseptorin ja proteiinien välisiä vuorovaikutusmekanismeja, on voitu luoda malleja proteiinin toiminnasta makeareseptorin aktivaatiossa. Makeiden proteiinien ja makeareseptorin välisten vuorovaikutusmekanismien tuntemista voidaan käyttää hyväksi kehiteltäessä proteiineja yhä makeammiksi, ja ennustaa proteiiniin tehtyjen muutosten vaikutusta sen makuun jo telakoitumisesta tehtyä molekyylihallia analysoimalla. Yksi esimerkki proteiinien muokkauksesta hypermakeaksi on Masudan työryhmineen luoma D21N-mutatoitu versio taumatiinista (T. Masuda *et al.*, 2016). Tutkimuksessa he tutkivat villityypin taumatiinin ja makeareseptorin välisiä vuorovaikutuksia telakoitumismallinnuksin, ja pyrkivät negatiivisia varauksia taumatiinista poistamalla luomaan siitä makeamman version. Mallinnuksia apuna käyttäen he onnistuivat löytämään yhden negatiivisesti varautuneen tähteen muuttamalla neutraaliksi, version joka oli 50% alkuperäistä taumatiinia makeampi, eli jopa 150 000 kertaa sakkaroosia makeampaa. Proteiinin aminohappotähteen muuttamisella emäksisemmiksi, komplementoiden reseptorin negatiivisia varauksia, oli huomattu olevan makeutta parantavia vaikutuksia aiemmin myös monelliinilla (Esposito *et al.*, 2006).

Makeutusaineena proteiinien täytyy myös olla verrattain stabiileja, sillä ne voivat joutua äärimmäisiin lämpötilan vaihteluihin, tai pH:n muutoksiin, joissa proteiinien kyky makeuttaa tuotetta tulisi säilyä. Esimerkiksi leivonnaisten makeuttamisessa proteiinien tulisi kestää lämpötilan vaihtelut tuotteiden kypsennyksessä, kun taas virvoitusjuomissa ne altistuvat alhaiselle pH:lle. Jotkin makeista proteiineista, kuten brazzein, ovat jo luonnossa esiintyvässä muodossa hyvin stabiileja, kun taas esimerkiksi monelliini hajoaa jo 50 °C lämpötilassa alayksiköikseen, menettäen makean makunsa. Monelliinissa olisi sen intensiivisen makeutensa puolesta paljon potentiaalia makeutusaineena, joten sen suhteen ongelma stabiiliuden kanssa ratkaistiin liittämällä alayksiköt kovalenttisesti yhteen ensin ekspressoimalla sitä yhtenä aminohappoketjuna (Kim *et al.*, 1989), ja myöhemmin linkittämällä alayksiköt yhteen linkkerin avulla (Tancredi *et al.*, 1992). Monelliinin luontaista muotoa onnistuttiin myös viime aikoina muokkaamaan niin, että sen makeus säilyi vielä 85 °C:ssa inkuboinnin jälkeen. Tämä tehtiin mutatoimalla monelliinin α -kierteen aminohappotähteitä alaniineiksi, ja analysoimalla eri mutaatioiden vaikutuksia proteiinin

makeuteen ja termostabiiliuteen. Ryhmä onnistui paikallistamaan monelliinista alueita, jotka olivat olennaisia monelliinin stabiiliudelle, ja selittämään mutaatioiden vaikutukset biofysikaalista mallinnusta hyödyntämällä. Tämä ja useat muut tutkimukset osoittavat, että makeiden proteiinien ominaisuuksia voidaan muokata bioinformatiikan, geenimanipulaation ja proteiinimodifikaation avulla. Samoja tekniikoita käyttämällä on siis mahdollista suunnitella myös uusia makeita proteiineja perustuen niiden rakenteen ja toiminnan välisiin suhteisiin (Liu *et al.*, 2016).

Makeita proteiineja voitaisiin käyttää elintarvikkeissa kahdella eri tavalla; joko käyttää niitä puhdistetussa muodossa makeutusaineena, tai ekspressoida makeiden proteiinien geenejä geenimuunnelluissa ruokakasveissa. Makeutusainekäytössä niiden tuottamisen oltava kannattavaa, ja tapahtua elintarvikkeissa käytettäväksi soveltuvalla menetelmällä. Niitä voidaan esimerkiksi taumatiinin, tavoin eristää sitä luonnossa tuottavasta kasvista, ekspressoida mikro-organismeissa tai muissa tuotantoon soveltuvissa kasveissa. Esimerkiksi brazzeinia ja monelliinia luonnossa tuottavat kasvit eivät tuota tarpeeksi proteiinia, jotta niiden viljely olisi kannattavaa, joten tuottoa muissa kasveissa ja mikro-organismeissa on tutkittu. Bioteknologian kehityksen myötä makeiden proteiinien geenejä on nykyään helppo siirtää eri kasveihin ja mikro-organismeihin ja niiden ekspressoiminen, eristäminen ja puhdistaminen ei ole enää yhtä haastavaa. Esimerkiksi brazzeinia on tuotettu onnistuneesti, ja verrattain edullisesti sekä maississa (Lamphear *et al.*, 2005), että GRAS-luokitellussa *Kluyveromyces lactis* -hiivassa (Yun *et al.*, 2016). Makeiden proteiinien tuottamisessa muissa organismeissa ongelmia ovat vielä proteiinien oikean laskostumisen takaaminen, proteiinin makeuden säilymiseksi, sekä kansainvälisten elintarvikevirastojen hyväksynnän saaminen geenimuunnellussa organismissa tuotetulle proteiinille.

Makeissa proteiineissa on paljon potentiaalia elintarviketeollisuudessa käytettäväksi niiden erittäin intensiivinen makeuden, vähäkalorisuuden ja pitkän käyttöhistorian vuoksi. On odotettavissa, että kun makeiden proteiinien tuotanto saadaan kannattavaksi, ja niiden käyttö saa elintarvikevirastojen hyväksynnän, voidaan niiden pohjalta rakentaa uuden sukupolven korkean intensiteetin makeutusaineita, jotka sopivat myös sokeriaineenvaihdunnan häiriöistä kärsiville ihmisille. Makeiden proteiinien rakenteen ja toiminnan välisistä suhteista tiedetään vielä verrattain vähän, mutta tutkimuksien pohjalta proteiinien ominaisuuksia osataan jo muuttaa proteiinitekniikan keinoin paremmin elintarviketeollisuuden menetelmiin sopiviksi. Mahdollista on myös löytää esimerkiksi bioinformatiikan keinoin uusia, vielä tuntemattomia, makeita proteiineja, jotka voisivat ominaisuuksiensa puolesta myös olla potentiaalisia makeuttajia.

Kirjallisuusviitteet

- Andreatta, M. M., Muñoz, S. E., Lantieri, M. J., Eynard, A. R., & Navarro, A. (2008). Artificial sweetener consumption and urinary tract tumors in cordoba, argentina. *Preventive Medicine*, 47(1), 136-139. 10.1016/j.ypmed.2008.03.015
- Ariyasu, T., Matsumoto, S., Kyono, F., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2003). Taste receptor T1R3 is an essential molecule for the cellular recognition of the disaccharide trehalose. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 39(1-2), 80-88. TRTIAE>2.0.CO;2
- Bohak, Z., & Li, S. -. (1976). The structure of monellin and its relation to the sweetness of the protein. *BBA - Protein Structure*, 427(1), 153-170. 10.1016/0005-2795(76)90293-2
- Caldwell, J. E., Abildgaard, F., Dzakula, Z., Ming, D., Hellekant, G., & Markley, J. L. (1998). Solution structure of the thermostable sweet-tasting protein brazzein. *Nature Structural Biology*, 5(6), 427-431. 10.1038/nsb0698-427
- Chéron, J. -, Golebiowski, J., Antonczak, S., & Fiorucci, S. (2017). The anatomy of mammalian sweet taste receptors. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 85(2), 332-341. 10.1002/prot.25228
- Choi, J. -, Lee, J., Choi, I. J., Kim, Y. -, Ryu, K. W., & Kim, J. (2016). Variations in TAS1R taste receptor gene family modify food intake and gastric cancer risk in a korean population. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60(11), 2433-2445. 10.1002/mnfr.201600145
- de Vos, A. M., Hatada, M., van der Wel, H., Krabbendam, H., Peerdeman, A. F., & Kim, S. H. (1985). Three-dimensional structure of thaumatin I, an intensely sweet protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(5), 1406-1409. 10.1073/pnas.82.5.1406
- Doré, A. S., Okrasa, K., Patel, J. C., Serrano-Vega, M., Bennett, K., Cooke, R. M., . . . Marshall, F. H. (2014). Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, 511(7511), 557-562. 10.1038/nature13396
- Dyer, J., Salmon, K. S. H., Zibrik, L., & Shirazi-Beechey, S. P. (2005). Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells. *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 302-305. 10.1042/BST0330302
- Esposito, V., Gallucci, R., Picone, D., Saviano, G., Tancredi, T., & Temussi, P. A. (2006). The importance of electrostatic potential in the interaction of sweet proteins with the sweet taste receptor. *Journal of Molecular Biology*, 360(2), 448-456. 10.1016/j.jmb.2006.05.020
- Flavor extract manufacturers association (FEMA). Retrieved from <https://www.femaflavor.org/>
- Foster, S. R., Porrello, E. R., Purdue, B., Chan, H. -, Voigt, A., Frenzel, S., . . . Thomas, W. G. (2013). Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart. *PLoS ONE*, 8(5)10.1371/journal.pone.0064579

- Fox, N. K., Brenner, S. E. & Chandonia, J. M. (2014). Lineage for protein: Brazzein. Retrieved from <http://scop.berkeley.edu/sunid=57178>
- Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. -, & Schiöth, H. B. (2003). The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular Pharmacology*, 63(6), 1256-1272. 10.1124/mol.63.6.1256
- Fuller, J. L. (1974). Single-locus control of saccharin preference in mice. *Journal of Heredity*, 65(1), 33-36. 10.1093/oxfordjournals.jhered.a108452
- Goudett, C., Gaven, F., Kniazeff, J., Vol, C., Liu, J., Cohen-Gonsaud, M., . . . Pin, J. P. (2004). Heptahelical domain of metabotropic glutamate receptor 5 behaves like rhodopsin-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(1), 378-383. 10.1073/pnas.0304699101
- Hellekant, G., & Danilova, V. (2005). Brazzein a small, sweet protein: Discovery and physiological overview. *Chemical Senses*, 30 SUPPL. 1, i89. 10.1093/chemse/bjh127
- Huang, C. -, & Tesmer, J. J. G. (2011). Recognition in the face of diversity: Interactions of heterotrimeric G proteins and G protein-coupled receptor (GPCR) kinases with activated GPCRs. *Journal of Biological Chemistry*, 286(10), 7715-7721. 10.1074/jbc.R109.051847
- Inglett, G. E., & May, J. F. (1969). Serendipity berries - source of a new intense sweetener. *Journal of Food Science*, 34(5), 408-411. 10.1111/j.1365-2621.1969.tb12791.x
- Kim, S. -, Kang, C. -, Kim, R., Cho, J. M., Lee, Y. -, & Lee, T. -. (1989). Redesigning a sweet protein: Increased stability and renaturability. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2(8), 571-575. 10.1093/protein/2.8.571
- Kim, S. -, Chen, Y., Abrol, R., Goddard, W. A., III, & Guthrie, B. (2017). Activation mechanism of the G protein-coupled sweet receptor heterodimer with sweeteners and allosteric agonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), 2568-2573. 10.1073/pnas.1700001114
- Kinnamon, S. C. (2012). Taste receptor signalling - from tongues to lungs. *Acta Physiologica*, 204(2), 158-168. 10.1111/j.1748-1716.2011.02308.x
- Koizumi, A., Nakajima, K. -, Asakura, T., Morita, Y., Ito, K., Shmizu-Ibuka, A., . . . Abe, K. (2007). Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(2), 585-589. 10.1016/j.bbrc.2007.04.171
- Koizumi, T., Terada, T., Nakajima, K. -, Kojima, M., Koshihara, S., Matsumura, Y., . . . Misaka, T. (2015). Identification of key neoculin residues responsible for the binding and activation of the sweet taste receptor. *Scientific Reports*, 5, 10338. 10.1038/srep12947
- Kuk, J. L., & Brown, R. E. (2016). Aspartame intake is associated with greater glucose intolerance in individuals with obesity. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 41(7), 795-798. 10.1139/apnm-2015-0675

- Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., . . . Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, *407*(6807), 971-977. 10.1038/35039564
- Laffitte, A., Neiers, F., & Briand, L. (2014). Functional roles of the sweet taste receptor in oral and extraoral tissues. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *17*(4), 379-385. 10.1097/MCO.0000000000000058
- Lamphear, B. J., Barker, D. K., Brooks, C. A., Delaney, D. E., Lane, J. R., Beifuss, K., . . . Howard, J. A. (2005). Expression of the sweet protein brazzein in maize for production of a new commercial sweetener. *Plant Biotechnology Journal*, *3*(1), 103-114. 10.1111/j.1467-7652.2004.00105.x
- Leone, S., Pica, A., Merlino, A., Sannino, F., Temussi, P. A., & Picone, D. (2016). Sweeter and stronger: Enhancing sweetness and stability of the single chain monellin MNEI through molecular design. *Scientific Reports*, 610.1038/srep34045
- Li, D., Jiang, P., Zhu, D., Hu, Y., Max, M., & Wang, D. (2008). Crystal structure of mabinlin II: A novel structural type of sweet proteins and the main structural basis for its sweetness. *Journal of Structural Biology*, *162*(1), 50-62. 10.1016/j.jsb.2007.12.007
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(7), 4692-4696. 10.1073/pnas.072090199
- Liu, Q., Li, L., Yang, L., Liu, T., Cai, C., & Liu, B. (2016). Modification of the sweetness and stability of sweet-tasting protein monellin by gene mutation and protein engineering. *BioMed Research International*, 201610.1155/2016/3647173
- Masuda, K., Koizumi, A., Nakajima, K. -, Tanaka, T., Abe, K., Misaka, T., & Ishiguro, M. (2012). Characterization of the modes of binding between human sweet taste receptor and low-molecular-weight sweet compounds. *PLoS ONE*, *7*(4)10.1371/journal.pone.0035380
- Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B., & Kitabatake, N. (2011). High-resolution structure of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin i. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, *67*(6), 652-658. 10.1107/S174430911101373X
- Masuda, T., Ohta, K., Ojiro, N., Murata, K., Mikami, B., Tani, F., . . . Kitabatake, N. (2016). A hypersweet protein: Removal of the specific negative charge at Asp21 enhances thaumatin sweetness. *Scientific Reports*, 610.1038/srep20255
- Ming, D., & Hellekant, G. (1994). Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from pentadiplandra brazzeana B. *FEBS Letters*, *355*(1), 106-108. 10.1016/0014-5793(94)01184-2
- Morini, G., Bassoli, A., & Temussi, P. A. (2005). From small sweeteners to sweet proteins: Anatomy of the binding sites of the human T1R2_T1R3 receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(17), 5520-5529. 10.1021/jm0503345

- Nelson, G., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Zhang, Y., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2001). Mammalian sweet taste receptors. *Cell*, *106*(3), 381-390. 10.1016/S0092-8674(01)00451-2
- Nirasawa, S., Nishino, T., Katahira, M., Uesugi, S., Hu, Z., & Kurihara, Y. (1994). Structures of heat-stable and unstable homologues of the sweet protein mabinlin. the difference in the heat stability is due to replacement of a single amino acid residue. *European Journal of Biochemistry*, *223*(3), 989-995. 10.1111/j.1432-1033.1994.tb19077.x
- Ohkubo, T., Tamiya, M., Abe, K., & Ishiguro, M. (2015). Structural basis of pH dependence of neoculin, a sweet taste-modifying protein. *PLoS ONE*, *10*(5)10.1371/journal.pone.0126921
- Paladino, A., Costantini, S., Colonna, G., & Facchiano, A. M. (2008). Molecular modelling of miraculin: Structural analyses and functional hypotheses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *367*(1), 26-32. 10.1016/j.bbrc.2007.12.102
- Picone, D., & Temussi, P. A. (2012). Dissimilar sweet proteins from plants: Oddities or normal components? *Plant Science*, *195*, 135-142. 10.1016/j.plantsci.2012.07.001
- Reed, D. R., & McDaniel, A. H. (2006). The human sweet tooth. *BMC Oral Health*, *6*(SUPPL. 1)10.1186/1472-6831-6-S1-S17
- Ren, X., Zhou, L., Terwilliger, R., Newton, S. S., & de Araujo, I. E. (2009). Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, *3*(JUN)10.3389/neuro.07.012.2009
- Roper, S. D., & Chaudhari, N. (2017). Taste buds: Cells, signals and synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(8), 485-497. 10.1038/nrn.2017.68
- Sanematsu, K., Kitagawa, M., Yoshida, R., Nirasawa, S., Shigemura, N., & Ninomiya, Y. (2016). Intracellular acidification is required for full activation of the sweet taste receptor by miraculin. *Scientific Reports*, *6*10.1038/srep22807
- Scientific opinion on the safety of the extension of use of thaumatin (E 957). (2015). *EFSA Journal*, *13*(11)10.2903/j.efsa.2015.4290
- Shimizu-Ibuka, A., Morita, Y., Terada, T., Asakura, T., Nakajima, K. -, Iwata, S., . . . Abe, K. (2006). Crystal structure of neoculin: Insights into its sweetness and taste-modifying activity. *Journal of Molecular Biology*, *359*(1), 148-158. 10.1016/j.jmb.2006.03.030
- Suez, J., Korem, T., Zeevi, D., Zilberman-Schapira, G., Thaiss, C. A., Maza, O., . . . Elinav, E. (2014). Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, *514*(7521), 181-186. 10.1038/nature13793 [doi]
- Sylvetsky, A. C., & Rother, K. I. (2016). Trends in the consumption of low-calorie sweeteners. *Physiology and Behavior*, *164*, 446-450. 10.1016/j.physbeh.2016.03.030
- Tancredi, T., Iijima, H., Saviano, G., Amodeo, P., & Temussi, P. A. (1992). Structural determination of the active site of a sweet protein A 1H NMR investigation of pMNEI. *FEBS Letters*, *310*(1), 27-30. 10.1016/0014-5793(92)81138-C

- Tancredi, T., Pastore, A., Salvadori, S., Esposito, V., & Temussi, P. A. (2004). Interaction of sweet proteins with their receptor: A conformational study of peptides corresponding to loops of brazzein, monellin and thaumatin. *European Journal of Biochemistry*, *271*(11), 2231-2240. 10.1111/j.1432-1033.2004.04154.x
- Temussi, P. A. (2002). Why are sweet proteins sweet? interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor. *FEBS Letters*, *526*(1-3), 1-4. 10.1016/S0014-5793(02)03155-1
- Temussi, P. A. (2011). Determinants of sweetness in proteins: A topological approach. *Journal of Molecular Recognition*, *24*(6), 1033-1042. 10.1002/jmr.1152
- van der Wel, H., & Loeve, K. (1972). Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *European Journal of Biochemistry*, *31*(2), 221-225. 10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x
- Vandermarliere, E., Lammens, W., Schoepe, J., Rombouts, S., Fierens, E., Gebruers, K., . . . Courtin, C. M. (2010). Crystal structure of the noncompetitive xylanase inhibitor TLXI, member of the small thaumatin-like protein family. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, *78*(10), 2391-2394. 10.1002/prot.22737
- Wu, H., Wang, C., Gregory, K. J., Han, G. W., Cho, H. P., Xia, Y., . . . Stevens, R. C. (2014). Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*, *344*(6179), 58-64. 10.1126/science.1249489
- Yun, C. -, Kong, J. -, Chung, J. -, Kim, M. -, & Kong, K. -. (2016). Improved secretory production of the sweet-tasting protein, brazzein, in *Kluyveromyces lactis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(32), 6312-6316. 10.1021/acs.jafc.6b02446
- Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Mueller, K. L., Cook, B., Wu, D., . . . Ryba, N. J. P. (2003). Coding of sweet, bitter, and umami tastes: Different receptor cells sharing similar signaling pathways. *Cell*, *112*(3), 293-301. 10.1016/S0092-8674(03)00071-0
- Zhao, G. Q., Zhang, Y., Hoon, M. A., Chandrashekar, J., Erlenbach, I., Ryba, N. J. P., & Zuker, C. S. (2003). The receptors for mammalian sweet and umami taste. *Cell*, *115*(3), 255-266. 10.1016/S0092-8674(03)00844-4