

Chemorezeption bakterieller Metaboliten durch Geruchsrezeptoren der Nase und Klasse C-GPCRs in Blutleukozyten

Lena Sophie Ball

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität
München zur Erlangung einer

Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Corinna Dawid

Prüfende der Dissertation:

1. Priv. Doz. Dr. Dietmar Krautwurst
2. Prof. Dr. Wilfried Schwab

Die Dissertation wurde am 04.07.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die TUM School of Life Sciences am 12.10.2024 angenommen.

“Everything is theoretically impossible until it is done.”

~ Robert A. Heinlein

VERÖFFENTLICHUNGEN UND BEITRÄGE

Peer-Reviewed

Ball L., Bauer, J. and Krautwurst D. (2023), Heterodimerization of Chemoreceptors TAS1R3 and mGlu₂ in Human Blood Leukocytes, *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 2023. DOI: 10.3390/ijms241612942.

Haag F., Frey T., **Ball L.**, Hoffmann S. and Krautwurst, D. (2024) Petrol Note in Riesling – 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) Selectively Activates Human Odorant Receptor OR8H1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72, 2024.

DOI: 10.1021/acs.jafc.3c08230

Ball L., Frey, T., Haag, F., Frank, S., Hoffmann S., Laska, M., Steinhaus, M., Neuhaus K. and Krautwurst D. (2024), Geosmin, a food and water deteriorating sesquiterpenoid and ambivalent semiochemical activates evolutionary conserved receptor OR11A1, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 72, 2024. DOI: 10.1021/acs.jafc.4c01515

Kongressbeitrag

Ball L., Bauer J., Krautwurst D.: Chemoreceptors TAS1R3 and mGluR2 heterodimerize in human blood leukocytes, ECRO 2022 – Annual Meeting, Berlin, Deutschland, 31.08. – 03.09.2022 (Posterpräsentation).

Vorträge im Rahmen des PhD Retreats und Young Researcher Seminars

Ball, L., Krautwurst, D.; Identification of endogenous, microbiotic or consumption-induced ligands for mGluR2/TAS1R3 in leukocytes, PhD Retreat, Freising, Deutschland, 15.10.2020.

Ball, L., Krautwurst, D.; Identification of endogenous, microbiotic or consumption-induced ligands for mGluR2/TAS1R3 in leukocytes, Young Researcher Seminar, Freising, Deutschland, 08.07.2021.

Ball, L., Krautwurst, D.; Chemoreceptors TAS1R3 and mGluR2 heterodimerize in human blood leukocytes, Young Researcher Seminar, Freising, Deutschland, 30.06.2022.

DANKSAGUNG

Auf dem langen Weg zu meiner erfolgreichen Promotion haben mich eine Vielzahl an Menschen unterstützt, gefördert und begleitet, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dietmar Krautwurst für die Überlassung dieses faszinierenden, herausfordernden und bedeutsamen Forschungsprojekts, der ausgezeichneten Betreuung, dem entgegengebrachten Vertrauen und dem überlassenen Freiraum der eigenen experimentellen Gestaltung und Ideenumsetzung meiner wissenschaftlichen Arbeit. Herzlichen Dank für die stets intensiven, anregenden und kreativen wissenschaftlichen Diskussionen, differenzierten Korrekturen von Manuskriptentwürfen und der fachlichen Unterstützung bei Vorträgen auf Retreats und Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann danke ich für die Förderung meiner Doktorarbeit im Rahmen des in-house Leibniz Pioneer Grants.

Für die fachliche sowie experimentelle Unterstützung in Bezug auf mikrobielle Fragestellungen über geosmin-produzierende Bakterien möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Klaus Neuhaus bedanken ebenso wie bei Christine Fritsch für die Herstellung der bakteriellen Überstände.

Herrn Dr. Oliver Frank danke ich für die wissenschaftliche Diskussion und umfassenden Unterstützung bei der chemischen Analyse des bakteriellen Überstands von *Pseudomonas aeruginosa*. Ein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang auch Verena Schlagbauer für die experimentelle Anleitung der HPLC-Analysen sowie der Durchführung von Vorversuchen und der Etablierung eines Fraktionierungsprotokolls.

Ein riesiges Dankeschön geht an meine Laborkolleg:innen. Besonders möchte ich hier Dr. Franziska Haag und Tamara Krämer für die wertvolle fachliche und persönliche Unterstützung, stetige Motivation und Zuspruch sowie den fachlichen Austausch danken. Auch bei Sandra Hoffmann, Corinna Kammermeier, Julia Bauer, Dr. Patrick Marcinek und Tim Frey möchte ich mich für die schöne gemeinsame Zeit und die anregenden Diskurse innerhalb und außerhalb des Labors, die uneingeschränkte Unterstützung, nicht nur im Rahmen von Publikationen, und die zahlreichen fachlichen und auch nicht ganz so fachlichen Gespräche bedanken, die den Laboralltag für mich sehr bereichert haben.

Mein herzlichster Dank geht an meine Familie, die mich immer und ganz selbstverständlich und uneingeschränkt unterstützt und mir die Sicherheit gibt, jederzeit für mich da und in allen Lebenslagen an meiner Seite zu sein. Euer Interesse und stetige Anteilnahme sowie eure guten Ratschläge und lieben Worte waren und sind für mich von unsagbarem Wert.

Genauso herzlich danke ich meinem Freund und Partner Christopher für seine stetige Unterstützung, Aufheiterung, Motivation, Geduld, Ausdauer und der Bestärkung immer zielorientiert weiter zu machen. Du warst und bist mir eine sehr große Stütze und ich bin unendlich dankbar, dich an meiner Seite zu haben!

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	vi
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	ix
TABELLENVERZEICHNIS.....	xi
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	xii
ZUSAMMENFASSUNG	1
ABSTRACT	4
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs).....	7
1.1.1 <i>Klassifizierung und Struktur</i>	7
1.1.2 <i>Geruchsrezeptoren – GPCRs der Klasse A</i>	8
1.1.3 <i>Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) und Geschmacksrezeptoren (TAS1Rs) – GPCRs der Klasse C</i>	14
1.2 Chemosensorische GPCRs im Immunsystem und darüber hinaus	23
1.2.1 <i>Polymorphkernige Leukozyten (Neutrophile) – Zellen des innate Immunsystems</i>	24
1.2.2 <i>T-Zellen – Zellen des adaptiven Immunsystems</i>	25
1.2.3 <i>Extranasale Expression olfaktorischer Rezeptoren</i>	27
1.2.4 <i>Ektopische Expression gustatorischer Rezeptoren (TAS1Rs und mGluRs)</i>	28
1.3 Heterodimerisierung von Klasse C GPCRs.....	34
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	36
2 MATERIAL UND METHODEN.....	38
2.1 Material.....	38
2.1.1 <i>Chemikalien und Aminosäuren</i>	38
2.1.2 <i>Lösungen, Puffer und Medien</i>	44
2.1.3 <i>Antikörper, Bakterienstamm, Enzyme, Kits und Liganden</i>	47
2.1.4 <i>Zelllinien</i>	49
2.1.5 <i>Oligonukleotide und Sonden</i>	49
2.1.6 <i>Plasmide und Plasmid-DNA</i>	50
2.1.7 <i>Geräte</i>	51
2.1.8 <i>Software und Datenbanken</i>	53
2.2 Molekularbiologische Methoden	54
2.2.1 <i>Isolation von PMNs und T-Zellen aus humanen Buffy Coats</i>	54
2.2.2 <i>RNA-Isolation aus gewonnenen PMNs und T-Zellen</i>	54
2.2.3 <i>RNA-Qualitätsbestimmung</i>	54
2.2.4 <i>cDNA-Synthese</i>	55
2.2.5 <i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	55

2.2.6	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	56
2.2.7	<i>Quantitative Real-Time PCR (qPCR)</i>	56
2.2.8	<i>Droplet Digital PCR (ddPCR)</i>	57
2.2.9	<i>Western Blot</i>	58
2.2.10	<i>Co-Immunpräzipitation (Co-IP)</i>	59
2.2.11	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	60
2.2.12	<i>Molekulare Klonierung von Rezeptoren und G-Proteinen</i>	60
2.3	Methoden der Bioinformatik	61
2.4	Zellbiologische Methoden	62
2.4.1	<i>Kultivierung von PMNs für Stimulationsstudien</i>	62
2.4.2	<i>Kultivierung von HEK-293 und NxG Zellen</i>	62
2.4.3	<i>Langzeitlagerung von HEK-293 und NxG-Zellen</i>	63
2.4.4	<i>Transiente Transfektion</i>	63
2.4.5	<i>cAMP-Lumineszenzassay</i>	64
2.4.6	<i>Quantifizierung der Oberflächenexpression von Rezeptoren</i>	68
2.5	Chemisch-Analytische Methoden	69
2.5.1	<i>HPLC</i>	69
3	ERGEBNISSE	71
3.1	Geosmin als Beispiel eines bakteriellen Metabolits und Geruchsstoffs aktiviert <i>in vitro</i> den Geruchsrezeptor OR11A1	71
3.1.1	<i>Konzentrationsabhängige Aktivierung des humanen OR11A1 durch Geosmin</i>	71
3.1.2	<i>Orthologe des OR11A1 unterscheiden sich in großem Maße in deren Sensitivitäten und Effizienzen gegenüber Geosmin</i>	72
3.1.3	<i>Geosmin aus bakteriellen Kulturen aktiviert doOR11A1 in nanomolaren Konzentrationen</i>	73
3.2	Genexpressionanalyse von GRMs und TAS1Rs in humanen PMNs und T-Zellen ..	76
3.2.1	<i>GRM2 und TAS1R3 zeigen in differentieller Genexpressionsanalyse höchste Expressionsraten auf</i>	76
3.2.2	<i>Genexpressionsanalyse verschiedener GRM2-Isoformen offenbart NM_000839.5 als die am häufigsten vorkommende Isoform</i>	77
3.2.3	<i>Erhöhte Genexpression von GRM2 und TAS1R3 nach 24-stündiger PMN-Stimulation mit Mononatriumglutamat</i>	78
3.3	Proteinanalyse von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs und T-Zellen	80
3.3.1	<i>Immunzytochemie weist Co-Expression der Proteine mGluR2 und TAS1R3 in PMNs nach</i>	80
3.3.2	<i>Western Blot und Co-Immunpräzipitation liefern Nachweis über Proteinheterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs und T-Zellen</i>	81
3.4	Analyse des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 im heterologen Zellsystem	83

3.4.1	<i>mGluR2 und TAS1R3 bilden heteromere Komplexe in transfizierten HEK-293 Zellen</i>	83
3.4.2	<i>Zelloberflächenexpression des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 ist signifikant höher als die des Homodimers mGluR2 und vergleichbar mit der Oberflächenexpression von TAS1R3</i>	84
3.4.3	<i>Das humane Heterodimer mGluR2/TAS1R3 zeigt in der funktionellen Analyse signifikant geringere IC50-Werte für MSG im Vergleich zu den Homodimeren auf</i>	86
3.5	Funktionsanalyse des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 in PMNs.....	91
3.5.1	<i>Mononatriumglutamat erleichtert die fMLF-induzierte IL-8-Sekretion humaner PMNs in vitro via mGluR2/TAS1R3</i>	91
3.5.2	<i>MSG und der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 erhöhen intrazelluläres Ca²⁺ in isolierten PMNs</i>	94
3.6	Identifizierung potentieller Agonisten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 im heterologen Zellsystem	96
3.6.1	<i>L- und D-Aminosäuren reagieren mit Ausnahme der L-Glutaminsäure nicht auf das Heterodimer mGluR2/TAS1R3</i>	96
3.6.2	<i>Bestandteile im Überstand von Pseudomonas aeruginosa weisen auf potentiellen Agonisten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 hin</i>	99
3.6.3	<i>Bekannte Komponenten aus dem Überstand von Pseudomonas aeruginosa zeigen keine Reaktion gegenüber mGluR2/TAS1R3, interagieren jedoch teilweise mit dem TAS1R3-Rezeptor</i>	105
3.6.4	<i>Fraktionierung des Überstandes von Pseudomonas aeruginosa mittels HPLC ergab Fraktionen mit signifikanter Rezeptorinteraktion im rekombinanten Testzellsystem</i>	107
3.6.5	<i>Die Auftrennung von Fraktion 13 mittels HPLC ergab vier Subfraktionen, von denen eine vergleichbare Signale zum ursprünglichen Überstand des Pseudomonas aeruginosas lieferte</i>	109
4	DISKUSSION	112
4.1	GPCRs und ihr Nachweis der Homo- und Heterodimerisierung.....	112
4.2	Identifizierung potentieller Agonisten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 ...	123
4.2.1	<i>Mononatriumglutamat</i>	123
4.2.2	<i>Substanz(en) aus dem Überstand von Pseudomonas aeruginosa</i>	127
4.3	Bakterielle Metabolite als potentielle Agonisten chemosensorischer GPCRs – Analyse, Potentiale und Ausblick	131
	ANHANG	138
	LITERATUR.....	147

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Klassifizierung und Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	8
Abbildung 1.2:	Molekulare Grundlage der mikrobiellen Geosminsynthese.....	10
Abbildung 1.3:	Schematische Darstellung des menschlichen Riechepithels sowie der Geruchsrezeptor-vermittelten Signaltransduktion in Geruchsneuronen.....	12
Abbildung 1.4:	Schematische Darstellung der verschiedenen Gruppen metabotroper Glutamatrezeptoren auf Prä- und Postsynapsen und derer Signaltransduktionswege nach Aktivierung mit ihrem Liganden Glutamat.	16
Abbildung 1.5:	Standardmodell des GDP/GTP Zyklus zur Regulation des GPCR Signalling.	17
Abbildung 1.6:	Schematische Darstellung verschiedener Geschmackspapillen auf der Zunge sowie des Aufbaus einer Geschmacksknospe.	19
Abbildung 1.7:	Schematische Darstellung der Geschmacksrezeptoren des Typ 1 (TAS1Rs) und ihrer Ligandenbindungsstellen.	20
Abbildung 1.8:	Signaltransduktion von TAS1-Rezeptoren im Zungengewebe.	22
Abbildung 2.1:	Schema der Signaltransduktion im heterologen Zellsystem.	65
Abbildung 2.2:	Abbildung der Photinus pyralis Luziferase.....	66
Abbildung 2.3:	Biolumineszenzreaktion der Photinus pyralis Luziferase.	67
Abbildung 2.4:	Experimenteller Ablauf und Normalisierung von mGluR2/TAS1R3 vermittelten Lumineszenzmessungen.	68
Abbildung 3.1:	Geosmin aktiviert in vitro den humanen Geruchsrezeptor OR11A1.....	71
Abbildung 3.2:	Orthologe von OR11A1 unterscheiden sich in ihrer Effizienz und Sensitivität gegenüber Geosmin sowie in ihrer Oberflächenexpression	73
Abbildung 3.3:	Geosmin bakteriellen Ursprungs aktiviert signifikant den doOR11A1-Rezeptor.	75
Abbildung 3.4:	Genexpressionsanalyse der Rezeptorgene aller GRMs und TAS1Rs in humanen Blutleukozyten.....	77
Abbildung 3.5:	Genexpressionsanalyse von GRM2-Isoformen in PMNs und T-Zellen.	78
Abbildung 3.6:	Relative Genexpressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von GRMs und TAS1Rs in PMNs nach 24-stündiger MSG-Stimulation.....	79
Abbildung 3.7:	Zweifarbige Immunzytochemie von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs.....	80
Abbildung 3.8:	Proteinexpression von mGluR2 und TAS1R3 in humanen PMNs und T-Zellen.	81
Abbildung 3.9:	Mittels BRET detektierte Heterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in transfizierten HEK-293 Zellen.....	84
Abbildung 3.10:	Relative Zelloberflächenexpressionslevel von mGluR2, TAS1R3 und dem Heterodimer mGluR2/TAS1R3.	85
Abbildung 3.11:	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für MSG in mGluR2, TAS1R3 bzw. mGluR2/TAS1R3 transfizierten HEK-293 Zellen.	88
Abbildung 3.12:	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für MSG in mGluR2 (murin), TAS1R3 (murin) bzw. mGluR2 (murin)/TAS1R3 (murin) transfizierten HEK-293 Zellen.....	89
Abbildung 3.13:	MSG erleichtert über das Heteromer mGluR2/TAS1R3 in vitro die fMLF-induzierte IL-8 Sekretion in isolierten PMNs.	92
Abbildung 3.14:	MSG und der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 erhöhen intrazelluläres Ca^{2+} in isolierten PMNs.	95

Abbildung 3.15:	Screening aller 20 proteinogen Aminosäuren in L- (A) und D-Form (B) gegen mGluR2, TAS1R3 und das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3 in einer Konzentration von 50 µmol/L.....	98
Abbildung 3.16:	Screening von 14 bakteriellen Überständen gegen mGluR2, TAS1R3 und das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3.	100
Abbildung 3.17:	Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit <i>P. aeruginosa</i> und <i>P. fluorescens</i> der gleichen OD (OD ₆₀₀ = 0,4).	101
Abbildung 3.18:	Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit ungefiltertem und gefiltertem <i>P. aeruginosa</i>	102
Abbildung 3.19:	Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit gefiltertem bzw. gefilterten und zusätzlich mittels SpeedVac getrocknetem <i>P. aeruginosa</i>	104
Abbildung 3.20:	Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für PQS (A) und cis-2-Dezensäure (B) in mGluR2, TAS1R3 bzw. mGluR2/TAS1R3 transfizierten HEK-293 Zellen mit ihren Strukturformeln.	106
Abbildung 3.21:	Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit einzelnen HPLC-Fractionen des gefilterten <i>P. aeruginosa</i>	107
Abbildung 3.22:	HPLC-Chromatogramm von Fraktion 13 des vorfraktionierten Überstandes von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	109
Abbildung 3.23:	Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit einzelnen HPLC-Subfraktionen von Fraktion 13 des gefilterten <i>P. aeruginosa</i>	110
Abbildung 4.1:	LBD-Komplementationsassay als Methode zur Detektion der Dimerisierung von GPCRs der Klasse C.	117
Abbildung 4.2:	Drei Kriterien und ihre jeweiligen Ansätze zum Nachweis einer Heterodimerisierung von GPCRs.	123
Abbildung 4.3:	Die drei wesentlichen QS-Systeme von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	128
Abbildung 4.4:	Strukturformeln von PQS und cis-2-Dezensäure, den potentiellen Agonisten von TAS1R3.	133
Abbildung A.1:	Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide.	142
Abbildung A.2:	Elektropherogramme der analysierten RNAs mit entsprechenden RIN-Werten.	143
Abbildung A.3:	Agarose Gelelektrophorese (0,7 % Agarose Gel) von PCR-Produkten aus unstimulierten Blutzellen.	144
Abbildung A.4:	Agarose Gelelektrophorese (0,7 % Agarose Gel) von PCR-Produkten aus stimulierten Blutzellen.	144
Abbildung A.5:	Konzentrationsabhängige Antwort von OR11A1-Orthologen auf Geosmin.	145
Abbildung A.6:	Der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 vereinfacht die fMLF (3 nM)-induzierte IL-8-Sekretion, die durch den mGluR2-Antagonisten 1 gehemmt wird.	146

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: Auflistung verwendeter Chemikalien.....	38
Tabelle 2.2: Auflistung verwendeter Aminosäuren.....	42
Tabelle 2.3: Auflistung verwendeter Lösungen, Medien und Puffer	44
Tabelle 2.4: Auflistung verwendeter Antikörper, Enzyme, Kits und Liganden	47
Tabelle 2.5: Auflistung verwendeter Zelllinien	49
Tabelle 2.6: Auflistung verwendeter Plasmide und Plasmid-DNA.....	50
Tabelle 2.7: Auflistung verwendeter Geräte.....	51
Tabelle 2.8: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken	53
Tabelle 3.1: EC ₅₀ -Werte von OR11A1-Orthologen gegenüber Geosmin und ihre evolutionären Beziehungen.....	72
Tabelle 3.2: Bakterienstämme mit ihren jeweiligen Identifizierungsnummern, verwendet für das Überstandsscreening mit OR11A1.....	73
Tabelle 3.3: Geosminkonzentrationen in Überständen von <i>S. albidoflavus</i> und <i>S. albus</i>	74
Tabelle 3.4: IC ₅₀ -Werte von MSG für mGluR2, TAS1R3 und das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3.....	86
Tabelle 3.5: IC ₅₀ -Werte von MSG für mGluR2 und dessen Kombination mit TAS1R1-TAS1R3.....	88
Tabelle 3.6: IC ₅₀ -Werte von MSG für die murinen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3	90
Tabelle 3.7: Bakterienstämme mit ihren jeweiligen Identifizierungsnummern, verwendet für das Überstandsscreening mit mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3	100
Tabelle 3.8: IC ₅₀ -Werte wichtiger Signalmoleküle von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> für mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3.....	106
Tabelle 4.1: Quorum sensing Moleküle von <i>P. aeruginosa</i> und ihre immunmodulatorischen Funktionen.....	129
Tabelle A.1: Oligonukleotidsequenzen für RT-qPCR	138
Tabelle A.2: Oligonukleotid- und SONDENSEQUENZEN FÜR ddPCR.....	139
Tabelle A.3: Vektorinterne Oligonukleotide	139
Tabelle A.4: NCBI Referenzsequenzen der für die qPCR, ddPCR bzw. Funktionsassays verwendeten Rezeptorgene	140
Tabelle A.5: EC ₅₀ -Werte von fMLF in behandelten und unbehandelten PMNs.....	146

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Å	Ångström
ACTB	Beta-Aktin (<i>engl.</i> Beta-actin)
AHL	N-Acyl-Homoserin-Lakton
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energietransfer
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.</i> complementary DNA)
CoCl ₂	Cobalt(II)-chlorid
CuSO ₄	Kupfersulfat
DAG	Diacyl-Glycerol
DMEM	<i>engl.</i> Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>engl.</i> Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELSD	<i>engl.</i> Evaporative Light Scattering Detector
EndoH	Endoglykosidase H
FA	Ameisensäure (<i>engl.</i> Formic acid)
FBS	Fötales Rinderserum (<i>engl.</i> Fetal Bovine Serum)
FeCl ₂	Eisen(II)-chlorid
fMLF	<i>engl.</i> N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FSC	<i>engl.</i> Forward Scatter
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (<i>engl.</i> G protein-coupled receptors)
GTP	Guanosintriphosphat
HAT-Medium	Natrium-Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin-Medium
HHQ	4-Hydroxy-2-Heptylquinolin
HPLC	<i>engl.</i> high performance liquid chromatography
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>engl.</i> Horseradish Peroxidase)
HSL	Homoserin Lakton
HT	HaloTag®
IL-8	Interleukin-8
IP ₃	Inositol 1,4,5-Triphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KFOs	Schlüsselgeruchsstoffe (<i>engl.</i> Key Food Odorants)
LB	Vollmedium zur Bakterienanzucht (<i>engl.</i> Lysogeny Broth)
LBD	Ligandenbindedomäne

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

M	Molar
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
mM	Millimolar
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid
MSG	Mononatriumglutamat (<i>engl.</i> Monosodium glutamate)
Na ₂ MoO ₄	Natriummolybdat
Na ₂ SeO ₄	Natriumselenat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NTC	<i>engl.</i> No Template Control
OD	Optische Dichte
OR	Geruchsrezeptor (<i>engl.</i> Odorant Receptor)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>engl.</i> Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction)
pg	Pikogramm
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PMNs	polymorphkernige Leukozyten (<i>engl.</i> polymorphonuclear leukocytes)
PQS	<i>Pseudomonas</i> Quinolon Signal
PTX	Pertussis-Toxin
qPCR	Quantitative Real-Time PCR
RIN	<i>engl.</i> RNA Integrity Number
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitationspuffer
RLU	Relative Lumineszenzeinheit (<i>engl.</i> Relative Luminescence Unit)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> Ribonucleic Acid)
RPMI-Medium	<i>engl.</i> Rosewell Park Memorial Institute-Medium
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>engl.</i> Sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	<i>engl.</i> Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSC	<i>engl.</i> Side Scatter
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>engl.</i> Tris-Buffered Saline
TDN	1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZnCl ₂	Zinkchlorid

ZUSAMMENFASSUNG

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes und hochentwickeltes sensorisches System aus interagierenden Zellen und zahlreichen Botenstoffen, mit der Fähigkeit 'nicht-Selbst' von 'Selbst' zu unterscheiden. Es empfängt, verarbeitet und bewertet kontinuierlich Informationen, die es nach Stimulation durch potenziell gefährliche Chemikalien und Krankheitserreger aus der inneren und äußeren Umgebung des Organismus von Rezeptoren erhält. Jüngste Studien zeigten, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) auf Blutleukozyten, wie Rezeptoren für freie Fettsäuren (FFAR), Chemokinrezeptoren, Komplementrezeptoren oder Formylpeptidrezeptoren eine grundlegende Rolle im angeborenen und adaptiven Immunsystem spielen, indem sie Krankheitserreger erkennen, Zellen zum Ort der Verletzung oder Infektion leiten und so die Immunantwort koordinieren. Chemosensorische GPCRs wie die Geschmacksrezeptoren TAS1Rs und TAS2Rs sowie Geruchsrezeptoren scheinen ebenfalls Teil der molekularen Ausrüstung zu sein, mit deren Hilfe sich Immunzellen in chemischen Gradienten orientieren. Genexpressionsstudien wiesen die Anwesenheit von Geruchsrezeptoren, aller 25 TAS2Rs und den drei TAS1Rs auf fünf verschiedenen Typen menschlicher Blutleukozyten nach, wo insbesondere die Geschmacksrezeptoren mitunter an der Chemotaxis menschlicher Neutrophiler und dem Schutz von T-Zellen vor dem aktivierungsbedingten Zelltod beteiligt sind. Zudem scheinen chemosensorische GPCRs in verschiedenen mikrobiomexponierten Grenzepithelien bspw. im Magen-Darm-Trakt bzw. den Atemwegen eine Art Sensorfunktion des innate Immunsystems einzunehmen.

Gemeinsam mit den TAS1Rs und einigen weiteren Rezeptoren bilden die metabotropen Glutamatrezeptoren (GluRs) die Klasse C der GPCRs, die mitunter die Fähigkeit besitzen, innerhalb ihrer Familien Heterodimere zu bilden. So führt die Heterodimerisierung zwischen TAS1Rs zum Süßgeschmacks- (TA1R2/TAS1R3) bzw. Umami-Geschmacksrezeptor (TAS1R1/TAS1R3) mit effektiv unterschiedlichen Ligandenspektren. Zudem wiesen neuere Studien mit Hilfe von heterologen Expressionsanalysen eine physische Interaktion verschiedener mGluRs sowie eine Funktionalität einzelner Heterodimere nach, deren zellulären Bedeutungen jedoch noch weitestgehend unklar sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe molekular- und zellbiologischer Methoden der Frage nachgegangen, ob Rezeptoren über Klasse-C-GPCR-Familien hinweg die Möglichkeit zur Bildung von Heterodimeren auf humanen Blutleukozyten besitzen. Genexpressionsanalysen lieferten in einem ersten Schritt den Nachweis über die Anwesenheit aller acht metabotropen Glutamatrezeptoren und der drei TAS1Rs in PMNs (Polymorphkernige Leukozyten) und T-Zellen, welche die Grundlage für mögliche physische Rezeptorinteraktionen bildete. Dabei

manifestierten sich *GRM2* und *TAS1R3* als die Gene mit den jeweils höchsten Transkriptniveaus innerhalb ihrer Rezeptorfamilien, deren Expressionsraten sich nach 24-stündiger Inkubation mit Mononatriumglutamat (MSG), einem Agonisten sowohl für mGluRs als auch den Umami-Rezeptor TAS1R1/TAS1R3, um ein bis zu 2,4-faches steigerten. Proteinanalysen von mGluR2 und TAS1R3 erbrachten mit Hilfe der Immunzytochemie und überlagernder Proteinsignale einen ersten Beleg für eine Co-Expression beider Rezeptoren in PMNs und in heterologen HEK-293 Zellen anhand eines BRET-Assays den Nachweis derer physischen Interaktion. Co-Immunopräzipitationen und Western Blots aus Proteinlysaten isolierter humaner PMNs und T-Zellen bestätigten schließlich die Anwesenheit beider Rezeptorproteine und lieferten einen eindeutigen Beweis für Protein-Protein-Interaktionen zwischen mGluR2 und TAS1R3 in beiden Blutzelltypen.

Für die darauffolgende Funktionsanalyse des Heterodimers konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein bereits für die Identifizierung von Geruchsrezeptoren und derer Agonisten bestehender cAMP-Lumineszenzassay in HEK-293 Zellen so modifiziert werden, dass dessen Anwendbarkeit für die funktionale Charakterisierung von mGluR2/TAS1R3 reproduzierbar gegeben war. Konzentrations-Wirkungsbeziehungen des Heterodimers mit MSG offenbarten im cAMP-Lumineszenzassay ein gegenüber dem Homodimer mGluR2 potenteres Rezeptorkonstrukt mit signifikant geringeren IC_{50} -Werten. Gleichzeitig wies das Heterodimer eine zu mGluR2 signifikant höhere Oberflächenexpression in transfizierten HEK-293 Zellen auf, die rückschlüssig einen Hinweis auf eine mögliche Chaperonfunktion von TAS1R3 im Dimer mit mGluR2 in Form eines erleichterten Transports des Rezeptors zur Zellmembran lieferte.

Mit Hilfe von rezeptorspezifischen Antagonisten konnte ferner gezeigt werden, dass das Heterodimer mit für eine MSG-induzierte Erleichterung der durch N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLF) stimulierten IL 8-Sekretion in PMNs verantwortlich ist und folglich an der Modulation von Immunantworten involviert zu sein scheint.

Im Zusammenhang mit der funktionellen Analyse von mGluR2/TAS1R3 stellte sich hierauf die Frage nach möglichen potentiellen Agonisten. Während ein erstes Aminosäure-Screening aller L- und D-Aminosäuren mit Ausnahme von L-Glutamat keine heterodimer-spezifische Rezeptorantwort hervorbrachte, lieferte in einem Screen bestehend aus 14 bakteriellen Überständen unterschiedlicher Spezies der Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* ein im Vergleich zu mGluR2 signifikant stärkeres Rezeptorsignal. Nachfolgende Analysen charakterisierten die unbekannte(n) Substanz(en) als sehr polare Verbindung(en) mit einer Größe von unter einem kDa. Fraktionierungen des bakteriellen Überstandes in 22 Subfraktionen mittels HPLC führten anschließend zur Identifizierung von einer für die Rezeptorantwort verantwortlichen Subfraktion, deren Charakterisierung in nachfolgenden Studien anhand von HPLC-, NMR- und cAMP Lumineszenz-Analysen zur Identifizierung des/der entsprechende(n) Agonist(en) erfolgen muss.

Daneben lieferte ein durchgeführtes Screening bekannter, im Überstand von *P. aeruginosa* bereits beschriebener Virulenzmoleküle mit PQS und der *cis*-2-Dezensäure zwei potentielle Agonisten für den TAS1R3 Rezeptor, deren mögliche Interaktionspartner, in erster Linie TAS1R1 bzw. TAS1R2, sowie deren immunologische Funktionen in weiterführenden Analysen ebenfalls aufgeklärt werden müssen.

Jedoch scheinen unter den chemosensorischen GPCRs nicht nur Geschmacksrezeptoren mit bakteriellen Molekülen bzw. Metaboliten interagieren und dadurch einen Einfluss auf die menschliche Physiologie nehmen zu können. Mehrere Studien aus den vergangenen Jahren berichten von einer Interaktion verschiedener Geruchsrezeptoren mit bakteriellen Metaboliten und einer damit einhergehenden Induktion von Mikroglia-Aktivierungen, der Renin-Sekretion und Blutdruckregulation sowie einer erhöhten Sekretion des anorektischen Darmhormonpeptids YY. Ein wesentliches Problem bei der Identifizierung möglicher Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen stellt in diesem Zusammenhang jedoch die Zuordnung von Geruchsrezeptoren zu ihren entsprechenden Agonisten dar, die einen immensen Beitrag zur Aufklärung physiologischer Prozesse liefern würden. Bis heute konnten lediglich für etwa 15 % der funktionalen humanen Geruchsrezeptoren rezeptorspezifische Liganden identifiziert werden. Mit Hilfe eines bidirektionalen Screening-Ansatzes gelang es in der vorliegenden Arbeit, den aus Bodenbakterien stammenden Metaboliten Geosmin als spezifischen Agonist für den Geruchsrezeptor OR11A1 zu identifizieren. Vergleiche der Rezeptorantworten gegenüber Geosmin zwischen sechs verschiedenen Spezies wiesen seine evolutionär konservierte Rezeptorfunktion nach. Dabei zeigte der Rezeptor der Wüsten-Kängururatte (doOR11A1) im Vergleich zum menschlichen Ortholog eine mehr als 100-fach höhere Sensitivität. Extrakte aus geosminproduzierenden Stämmen von *Streptomyces albus* und *Streptomyces albidoflavus*, deren Geosminkonzentrationen mittels GC-GC-HRMS exakt quantifiziert wurden, lieferten eine eindeutige Rezeptorantwort von doOR11A1, die es der Känguru-Ratte ermöglicht, Geosmin im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich wahrzunehmen.

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit über den Nachweis eines funktionellen Heterodimers mGluR2/TAS1R3 in humanen Blutleukozyten sowie der Identifizierung von (bisher unbekannt) bakteriellen Metaboliten als mögliche Agonisten für chemosensorische Rezeptoren liefern einen Beitrag zur Aufklärung und zu einem besseren Verständnis über deren außerordentlichen, funktionellen Beitrag dieser Proteine im gesamten menschlichen Körper. Dies birgt enormes Potential für diverse Anwendungsbereiche der Medizin, Ernährungsforschung sowie für biotechnologischer Verfahren und könnte langfristig neue Möglichkeiten in Hinblick auf gezielte Interventionsmöglichkeiten eröffnen.

ABSTRACT

The human immune system is a complex and highly developed sensory system consisting of interacting cells and numerous messenger substances, with the ability to discriminate ‘non-self’ from ‘self’. It continuously receives, processes and evaluates information from receptors after stimulation by potentially dangerous chemicals and pathogens from the organism's internal and external environment. Recent studies have shown that G protein-coupled receptors (GPCRs) on blood leukocytes, such as free fatty acid receptors (FFAR), chemokine receptors, complement receptors or formyl peptide receptors, play a fundamental role in the innate and adaptive immune system by recognising pathogens, directing cells to the site of injury or infection and thus coordinating the immune response. Chemosensory GPCRs such as the taste receptors TAS1Rs and TAS2Rs as well as olfactory receptors also appear to be part of the molecular equipment that enables immune cells to orientate themselves within chemical gradients. Gene expression studies demonstrated the presence of odorant receptors, all 25 TAS2Rs and the 3 TAS1Rs on 5 different types of human blood leukocytes, where the taste receptors in particular are involved in the chemotaxis of human neutrophils and the protection of T cells from activation-induced cell death. In addition, chemosensory GPCRs in various microbiome-exposed border epithelia, e.g. in the gastrointestinal tract or respiratory tract, appear to fulfil a sensory function of the innate immune system.

Together with the TAS1Rs and some other receptors, the metabotropic glutamate receptors (GluRs) form class C of GPCRs, which have the ability to form heterodimers within their families. Thus, heterodimerisation between TAS1Rs leads to the sweet taste receptor (TAS1R2/TAS1R3) or umami taste receptor (TAS1R1/TAS1R3) with effectively different ligand spectra. In addition, recent studies using heterologous expression analyses demonstrated a physical interaction of different mGluRs as well as a functionality of individual heterodimers, the cellular significance of which, however, is still largely unknown.

In the present study, molecular and cell biological methods were used to investigate whether receptors across class C GPCR families have the ability to form heterodimers on human blood leukocytes. In a first step, gene expression analyses provided evidence for the presence of all eight metabotropic glutamate receptors and the three TAS1Rs in PMNs (polymorphonuclear leukocytes) and T cells, which formed the basis for possible physical receptor interactions. GRM2 and TAS1R3 were found to be the genes with the highest transcript levels within their receptor families, and their expression levels increased up to 2.4-fold after 24 h incubation with monosodium glutamate (MSG), an agonist for both mGluRs and the umami receptor

TAS1R1/TAS1R3. Protein analyses of mGluR2 and TAS1R3 provided initial evidence of co-expression of both receptors in PMNs using immunocytochemistry and overlapping protein signalling, and evidence of their physical interaction in heterologous HEK-293 cells using a BRET assay. Finally, co-immunoprecipitations and Western blots of proteins from isolated human PMNs and T-cells confirmed the presence of both receptor proteins and provided strong evidence for protein-protein interactions between mGluR2 and TAS1R3 in both blood cell types. For the subsequent functional analysis of the heterodimer, a cAMP luminescence assay already used for the identification of olfactory receptors and their agonists could be modified in HEK-293 cells within the scope of the present work in such a way that its applicability for the functional characterisation of mGluR2/TAS1R3 was reproducible. Concentration-response relationships of the heterodimer with MSG revealed a more potent receptor construct with significantly lower IC_{50} values compared to the homodimer mGluR2 in the cAMP luminescence assay. At the same time, the heterodimer showed a significantly higher surface expression compared to mGluR2 in transfected HEK-293 cells, which provided conclusive evidence for a possible chaperone function of TAS1R3 in the dimer with mGluR2 in the form of facilitated transport of the receptor to the cell membrane.

Using receptor-specific antagonists, it was further shown that the heterodimer is involved in MSG-induced facilitation of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF)-stimulated IL-8 secretion in PMNs and consequently appears to be implicated in the modulation of immune responses.

In the context of the functional analysis of mGluR2/TAS1R3, this raised the question of possible potential agonists. While an initial amino acid screen of all L- and D-amino acids, with the exception of L-glutamate, did not produce a heterodimer-specific receptor response, in a screen consisting of 14 bacterial supernatants of different species, the supernatant from *Pseudomonas aeruginosa* produced a significantly stronger receptor signal compared to mGluR2. Subsequent analyses characterised the unknown substance(s) as polar compound(s) with a size of less than one kDa. Fractionation of the bacterial supernatant into 22 subfractions by HPLC subsequently led to the identification of a subfraction responsible for the receptor response, which will be characterised in subsequent studies using HPLC, NMR and cAMP luminescence analyses to finally identify the corresponding agonist(s).

In addition, a screening of known virulence molecules already described in the supernatant of *P. aeruginosa* yielded two potential agonists for the TAS1R3 receptor in the form of PQS and cis-2-decenoic acid, whose possible interaction partners, primarily TAS1R1 and TAS1R2, as well as their immunological functions, must also be elucidated in further analyses.

However, among the chemosensory GPCRs, not only taste receptors appear to interact with bacterial molecules or metabolites and thereby exert an influence on human physiology. Several studies from recent years have reported an interaction of various odorant receptors with bacterial metabolites and an associated induction of microglia activation, renin secretion and blood pressure regulation as well as an increased secretion of the anorectic intestinal hormone peptide YY. A major problem in the identification of possible receptor-ligand interactions in this context, however, is the assignment of odorant receptors to their corresponding agonists, which would make an immense contribution to the elucidation of physiological processes. To date, receptor-specific ligands have only been identified for about 15 % of functional human odorant receptors. Using a bidirectional screening approach, the present study was able to identify the soil bacteria-derived metabolite geosmin as a specific agonist for the odorant receptor OR11A1. Comparisons of the receptor responses to geosmin between six different species demonstrated its evolutionarily conserved receptor function. The receptor of the desert kangaroo rat (doOR11A1) showed a more than 100-fold higher sensitivity compared to the human orthologue. Extracts from geosmin-producing strains of *Streptomyces albus* and *Streptomyces albidoflavus*, whose geosmin concentrations were quantified exactly by GC-GC-HRMS, showed a unique receptor response of doOR11A1, which enables the kangaroo rat to perceive geosmin in the low nanomolar concentration range.

The results of the present work on the detection of a functional heterodimer mGluR2/TAS1R3 in human blood leukocytes as well as the identification of (previously unknown) bacterial metabolites as possible agonists for chemosensory receptors provide an contribution to the elucidation and better understanding of the incredible functional contribution of these proteins in the entire human body. This offers enormous potential for various areas of application in medicine, nutritional research and biotechnological processes and could open up new possibilities in the future with regard to targeted interventions.

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*engl.* G Protein-Coupled Receptors (GPCRs)) bilden die größte Familie aller im menschlichen Genom codierten Transmembranproteine. Als substantielle Bestandteile bei der Vermittlung zellulärer Antworten auf extrazelluläre Signale wie Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Immunmodulatoren, Gerüche und Geschmacksmoleküle passen die ~800 bekannten Rezeptoren die Physiologie von Zellen und Geweben über Signalwege via G-Proteinen an und regulieren auf diese Weise grundlegende, zelluläre Funktionen wie Stoffwechselprozesse, Migration, Wachstum und neuronale Aktivitäten [1-4]. Aufgrund ihrer hohen Affinität für eine Vielzahl modulatorischer Stimuli in diversen Prozessen des menschlichen Körpers bilden GPCRs zudem wichtige Ziele für die Entwicklung von Arzneimitteln [5].

1.1.1 Klassifizierung und Struktur

Basierend auf phylogenetischen Sequenz- und Strukturanalysen erfolgt die Einteilung der GPCR-Familie in 6 Hauptgruppen: Rhodopsin (Klasse A), Sekretin (Klasse B1), Adhäsion (Klasse B2), Glutamat (Klasse C), Rezeptoren für Ste2-ähnliche Pilzpheromone (Klasse D1), und Frizzled (Klasse F) und TAS2Rs (Klasse T), wobei für Klasse D1 kein humanes Ortholog existiert [1] (Abb. 1.1 A). Ihnen allen gemein ist deren struktureller Aufbau, bestehend aus einem Bündel sieben transmembraner α -Helices, die über jeweils drei extra- und intrazelluläre Schleifen (extra- und intracellular loops, ECL und ICL) variabler Länge miteinander verbunden sind, wobei sich der N-Terminus der Rezeptoren auf der extrazellulären Seite der Zellmembran befindet, der C-Terminus dagegen intrazellulär lokalisiert ist [6] (Abb. 1.1 B). Die Bindung eines Agonisten an extrazelluläre Regionen, oder im Falle der Klasse A GPCRs innerhalb der Transmembranhelices, resultiert in Konformationsänderungen, infolgedessen es intrazellulär zu einer Wechselbeziehung mit zytosolischen Signalproteinen kommt [6].

Verglichen mit den anderen GPCR-Klassen besitzen Rezeptoren der Rhodopsin-Familie (Klasse A), welche die größte Anzahl an Mitgliedern aufweist und zu denen auch die Geruchsrezeptoren gezählt werden, mit einem kurzen N-terminalen Ende einen relativ einfachen strukturellen Aufbau. Im Gegensatz dazu zeichnen sich die Klassen B und F durch längere extrazelluläre (EZD) bzw. cysteinreiche Domänen (CRD) aus, die als Teil der Bindungsstelle zur Erkennung von Liganden fungieren. Ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal der Klasse C GPCRs ist die Ausbildung konstitutiver Homo- und Heterodimere, die durch ihre lan-

gen, die ‚Venus Flytrap‘ (VFTD)- und cysteinreiche Domäne enthaltenden, N-Termini vermittelt werden (Abb. 1.1 B). Dieser Klasse gehören hauptsächlich die metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs) und Geschmacksrezeptoren (TAS1Rs) an [3, 7-11].

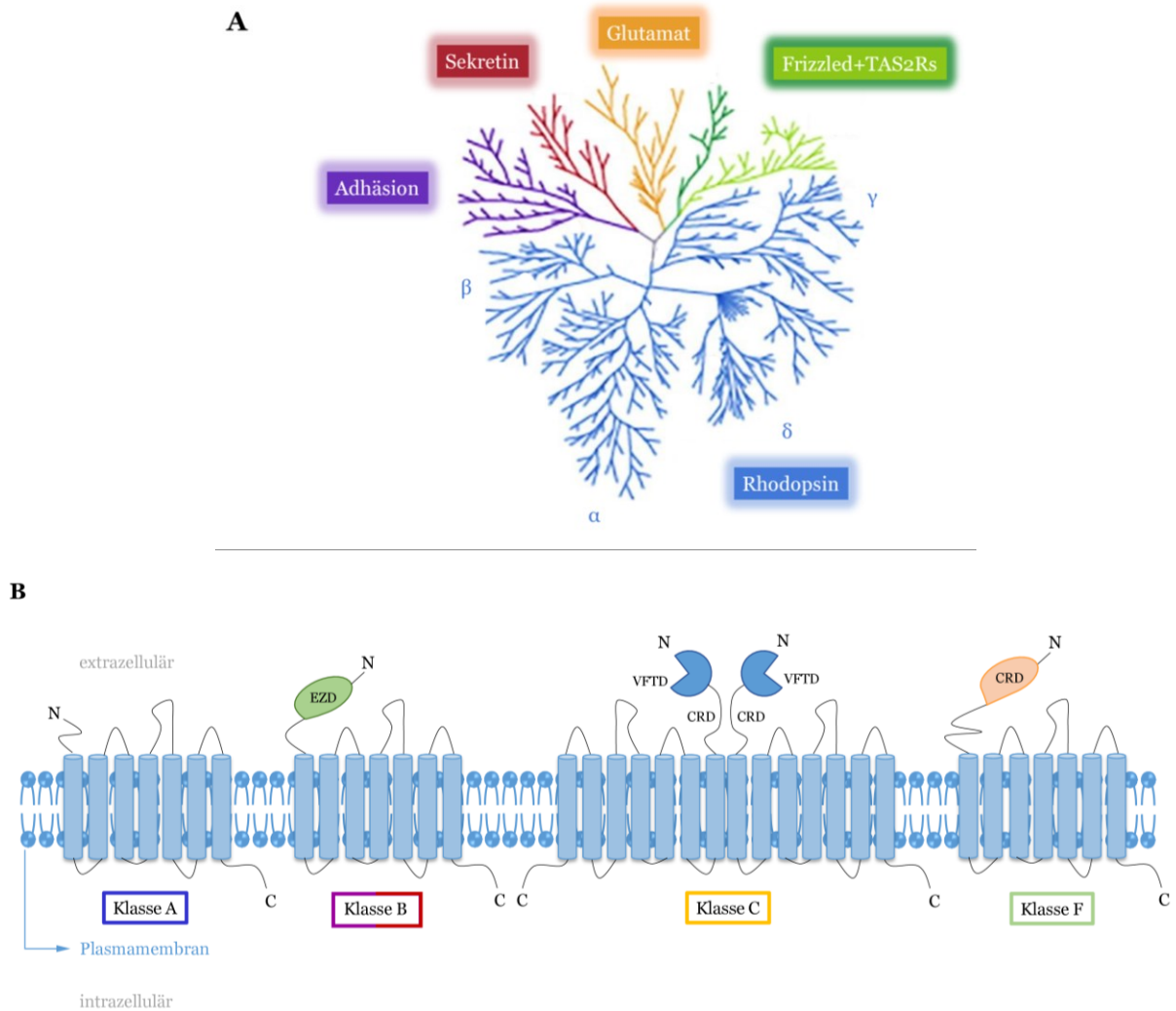


Abbildung 1.1: Klassifizierung und Struktur G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. A: Phylogenetische Beziehung zwischen GPCRs im menschlichen Genom. Unterschiedliche Farben geben die verschiedenen Hauptgruppen an. Abbildung verändert nach Wu et al. (2017) [12]. B: Strukturelle Eigenschaften von GPCRs unterschiedlicher Klassen. Abkürzungen: EZD = Extrazelluläre Domäne; VFTD = Venus flytrap Domäne; CRD = Cysteinreiche Domäne. Abbildung modifiziert nach Qu et al. (2020) [9] und Wu et al. (2014) [11].

1.1.2 Geruchsrezeptoren – GPCRs der Klasse A

Gemeinsam mit dem Geschmackssinn bildet der Geruchssinn die chemischen Sinne [13]. Seine Hauptfunktion umfasst die Detektion und Unterscheidung tausender flüchtiger Verbindungen, den Aromastoffen. Diese Eigenschaft ist mitunter für die Auswahl und Evaluation täglich konsumierter Lebensmittel von wesentlicher Bedeutung und verhindert zudem den Verzehr verdorbener Nahrung [14]. Die Wahrnehmung von Aromastoffen erfolgt sowohl orthonasal

durch die Nase, als auch retronasal über den Rachenraum nach deren durch Kauen vermittelten Freisetzung [15]. Dabei können thermisch verarbeitete bzw. fermentierte Lebensmittel wie Bier, Brot oder Wein weit mehr als 800 flüchtige Verbindungen enthalten. Aber auch pflanzliche Lebensmittel wie Gemüse und Obst beinhalten eine Vielzahl unterschiedlicher Aromastoffe [15]. Bis heute wurden insgesamt 10 000 flüchtige Verbindungen in Lebensmitteln identifiziert, wovon etwa 230 zu den sogenannten Schlüsselgeruchsstoffen (KFOs – *engl.* Key Food Odorants) gezählt werden. Eine Kombination aus lediglich 3-40 KFOs bildet den typischen Geruch eines Lebensmittels [16, 17].

PFLANZENMETABOLITE ALS GERUCHSSTOFFE AM BEISPIEL VON TDN Die Grundlagen der globalen Lebensmittelproduktion stammen aus natürlichen Ressourcen pflanzlicher und tierischer Herkunft. Pflanzen als sessile Organismen beherbergen ein enormes Spektrum von tausenden flüchtigen Signalstoffen, die ihnen die Fähigkeit zu Interaktion mit anderen Pflanzen verleiht sowie als Lockstoff für samenverbreitende Tiere und bestäubende Insekten dienen [18]. In der Tat handelt es sich bei diesen chemischen Verbindungen um die evolutionär älteste Form der Kommunikation, die der Mensch im Laufe der Entwicklung für sich und seine Bedürfnisse immer weiter zu verstehen gelernt hat – in Form von Präferenzen für spezifische Aromen reifer Früchte und dem Anbau bestimmter Nutzpflanzen [18, 19]. Ein Beispiel stellt in diesem Zusammenhang die Weinrebe (*Vitis vinifera*), eine der wirtschaftlich wichtigsten Obstpflanzen, die in zahlreichen Rebsorten wie dem Riesling vorkommt, dar [20]. Abhängig von Riesling-Sorte und Weinbaugebiet besitzt die Nutzpflanze ein Riesling-typisches Geruchsbild mit fruchtigen, blumigen, honigartigen aber auch petrolartigen Duftaromen, die von aromarelevanten flüchtigen Verbindungen und deren Vorstufen, z.B. Carotinoiden, geprägt sind [21-23]. Die kerosin- bzw. petroleumartige Note des Rieslings wird durch 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalin (TDN) verursacht [24], das in mäßigen Konzentrationen Bestandteil des Aromas eines gereiften Rieslingweins ist [24-26] sowie in weiteren Früchten wie der Passionsfrucht (*Passiflora edulis* Sims) [27], dem Pfirsich (*Prunus persica*) [28] und der Erdbeere (*Fragaria x ananassa*) [29] zu finden ist. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte TDN als potenter Agonist des Geruchsrezeptors OR8H1 identifiziert werden [30].

BAKTERIELLE METABOLITE ALS GERUCHSSTOFFE AM BEISPIEL VON GEOSMIN Der Gebrauch des Begriffs „Geruchstoff“ erfolgt wie die Verwendung der Bezeichnung „Geschmackstoff“ wertfrei. So kann dieselbe Verbindung mit an der Entfaltung einer typischen Geruchsnote beteiligt sein und in einem anderen Kontext einen Fehlgeruch (off-flavour) hervorrufen, der zu einer Ablehnung des Lebensmittels und in Folge dessen zu massiven kommerziellen Einbußen führen kann [15]. Ein typisches Beispiel stellt in diesem Zusammenhang das bizy-

liche und flüchtige Sesquiterpenoid Geosmin ((4S,4aS,8aR)-4,8a-dimethyloctahydronaphthalen-4a(2H)-ol) dar [31]. 1965 erstmals isoliert [32], verleiht der erdige Geruch des Geosmins Duftstoffen und Parfümen eine frische Note [33, 34] während es in der Lebensmittelindustrie aufgrund seines „erdig-muffigen“ Beigeschmacks maßgeblich für Qualitätseinbußen von Nahrungsmitteln und Getränken wie Bohnen [35], Kakao [36], Fisch [37-39], Trinkwasser [40-44], Wein [45, 46] und Traubensaft [47, 48] verantwortlich ist.

Geosmin wird in erster Linie von Mikroorganismen produziert, die hauptsächlich in terrestrischen Umgebungen vorkommen. Dazu zählen unter anderem im Boden lebende Actinomyzeten wie beispielsweise *Streptomyces albidoflavus*, *Streptomyces albus* oder *Nocardia fluminea* [44, 49-52]. Aber auch bestimmte Arten von Pilzen [47, 53, 54], Myxo- und Cyanobakterien [55-59] sind als Produzenten von Geosmin bekannt, ebenso wie Gefäßpflanzen wie Rote Beete [60] und Kaktusblüten [61].

Die molekulare Grundlage der mikrobiellen Geosminsynthese beruht auf der Umwandlung von Farnesyldiphosphat in Germacradienol und weiter in Geosmin [62] mit Hilfe einer Sesquiterpen-Synthase, codiert von einem Geosmin-Synthase-Gen (*geoA*), welches in einer Vielzahl von Cyanobakterien und Bakterien aus der terrestrischen sowie aquatischen Umwelt exprimiert wird [49, 63-66] und phylogenetisch konserviert ist [67] (Abb. 1.2).

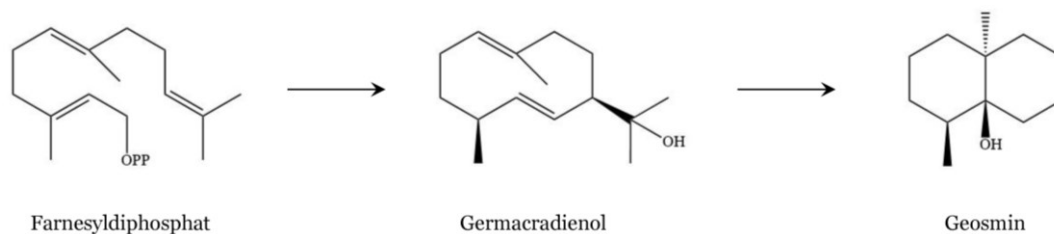


Abbildung 1.2: Molekulare Grundlage der mikrobiellen Geosminsynthese

Trotz der weiten Verbreitung von Geosmin ist seine biologische Funktion bis heute nur teilweise geklärt. Bekannt ist, dass Geosmin als flüchtiger, chemosensorischer Botenstoff unterschiedliche Reaktionen in Form von Anziehungs- und Vermeidungsverhalten in verschiedenen Spezies auslösen [68]: Während geosminreiche Umgebungen einen bevorzugten Eiablageplatz für die Stechmücke *Aedes aegypti* darstellen [69] und Elefanten [70] und Kamele [71] den Geruch von Geosmin über große Entfernungen mit Wasserquellen in Verbindung bringen, erzeugt der Geruchsstoff bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ein Abwehrverhalten gegenüber verfallener Früchte und somit gegenüber dem Konsum toxischer Verbindungen [72]. Ein ähnlich abschreckendes Signal wurde für den bakterienfressenden Wurm *Caenorhabditis elegans* berichtet, der in Anwesenheit von mikrobiellem Geosmin ein reduziertes Jagdverhalten zeigte [73].

DIE GERUCHSWAHRNEHMUNG AUF ZELLULÄRER EBENE Der Geruchssinn beginnt im Riechepithel, der *Regio olfactoria*, die sich in der obersten Conche der Nasenhöhle befindet, eine Fläche von etwa 5 cm² einnimmt und von einer Mukus-Schicht bedeckt ist [74] (Abb. 1.3 A). Sie besteht aus insgesamt drei verschiedenen Zelltypen, den Stützzellen, Basalzellen und den eigentlichen Riechzellen, bei denen es sich um Geruchsneurone (*engl.* olfactory sensory neurons (OSN)) handelt, von denen der Mensch ~ 30 Millionen besitzt [75]. Aufgrund ihrer durchschnittlichen Lebensdauer von etwa einem Monat unterliegen die OSNs einem permanenten Erneuerungsprozess, gewährleistet durch Ausdifferenzierung von Basalzellen (Stammzellen) [75]. An der apikalen Seite des Riechepithels werden die OSNs zudem von Stützzellen geschützt, indem sie tote Neurone phagozytieren bzw. schädliche Substanzen aus der Luft entgiften [76]. Eine Basalmembran trennt das Riechepithel von der Lamina propria, in der die Bowman-Drüsen enthalten sind, welche wesentlich an der Bildung des Riechschleims beteiligt sind [77].

Die bipolaren olfaktorischen Geruchsneuronen sind an ihrem apikalen Ende mit einer Vielzahl an in den Mukus ragenden Zilien ausgestattet, in deren Plasmamembran Geruchsrezeptoren exprimiert werden, wo sie in direkten Kontakt mit Geruchsstoffen aus der Atemluft in der Nasenhöhle treten können [78]. Die Axone auf der basalen Seite verlaufen in Bündeln zu tausenden durch die Siebbeinplatte (*Lamina cribrosa*) und kommen als gemeinsamer Geruchsnerv (*Nervus olfactorius*) im Riechkolben (*Bulbus olfactorius*) an, der als vorgelagerter Hirnteil betrachtet wird. In diesem Bereich endigen die Axone in Glomeruli, welche zusammen mit Dendriten der Mitralzellen Synapsen bilden [75]. Über Axone der Mitralzellen, die zusammen den Geruchstrakt (*Tractus olfactorius*) darstellen, erfolgt die Geruchsweiterleitung in tiefere Gehirnregionen wie dem Thalamus und der Amygdala [77].

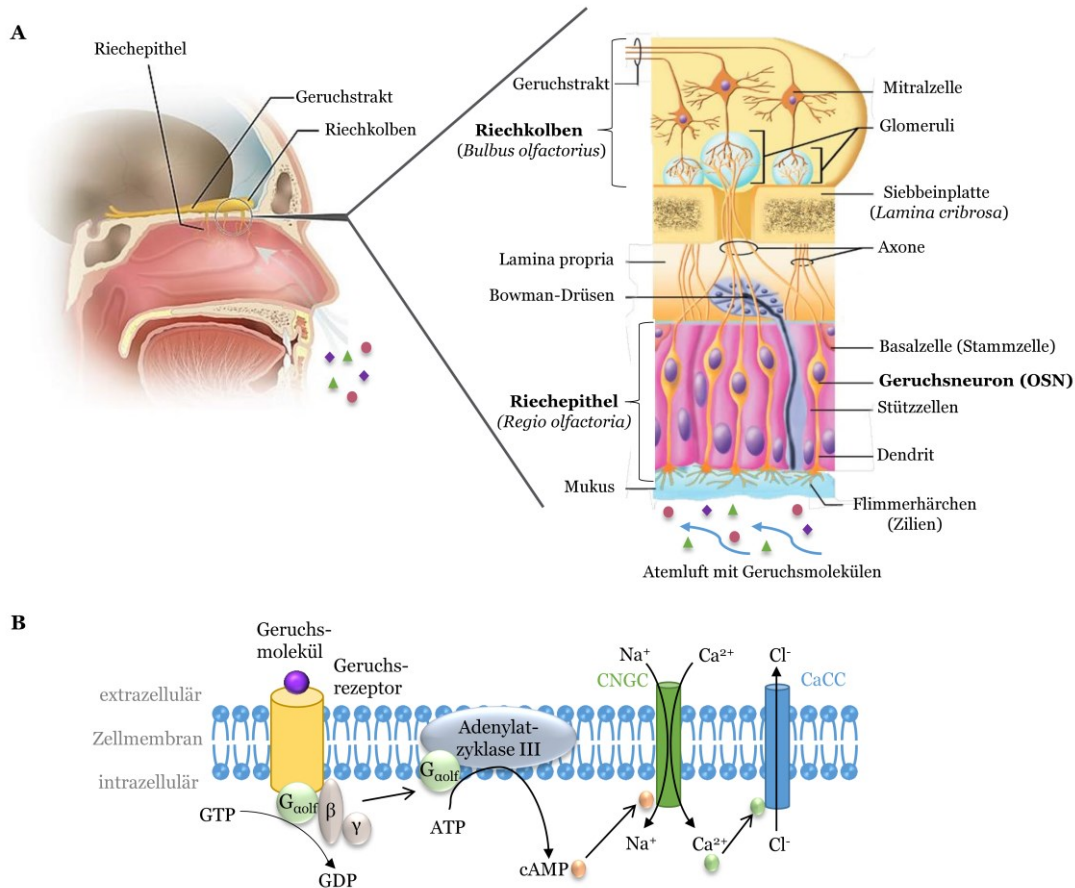


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des menschlichen Riechepithels sowie der Geruchsrezeptor-vermittelten Signaltransduktion in Geruchsneuronen. **A:** Aufbau des menschlichen Riechepithels. Abbildung modifiziert nach Moon et al. (2014) [78] und Xydakis et al. (2021) [79]. **B:** Signaltransduktion von ORs im OSN. Die Bindung eines Geruchsstoffes an einen Geruchsrezeptor resultiert in einer G_{αolf}-aktivierten Stimulation der Adenylatzyklase Typ III, welche die Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert. Via cAMP wird der CNGC-Ionenkanal aktiviert, der einen Influx mono- und divalenter Kationen (Natrium- und Kalzium) ermöglicht und eine Depolarisation der Zelle erreichen. Kalzium-Ionen öffnen Ca²⁺-abhängige Chlorid-Kanäle (CaCCs), aus denen Chlorid-Ionen ausströmen und eine Verstärkung der Zelldepolarisation induzieren. Abbildung modifiziert nach Kaupp (2010) [80].

In den geruchswahnehmenden Organen von Säugetieren wurden fünf Typen unterschiedlicher chemosensorischer GPCRs identifiziert [80]: Die TAARs (*engl.* Trace Amine-associated Receptors), die erstmalig 2001 beschrieben wurden [81], erkennen vorwiegend flüchtige sowie biogene Amine [82]. Vomeronasal-Rezeptoren lassen sich in zwei Familien unterteilen – V1Rs, die in den apikalen Zellen des Neuroepitheliums zu finden sind und dort Pheromone detektieren [83, 84], und V2Rs, die in den basalen Zellen exprimiert werden, MHC-Komplexe erkennen und beim Menschen pseudogenisiert sind [85-89]. FPRs (*engl.* Formyl Peptide Receptors) wurden in den Riechepithelzellen identifiziert, wo sie mit krankheits- bzw. entzündungsbezogenen Liganden assoziiert sind und Einfluss auf die Immunantwort nehmen [90, 91]. Mit ~400 funktionellen Rezeptorgenen stellt die Gruppe der eigentlichen Geruchsrezeptoren (OR – *engl.*

Odorant Receptor) die größte unter den chemosensorischen Rezeptoren dar [92-95]. Vorwiegend im Riechepithel der Nase exprimiert, sind sie in der Lage 10 000 flüchtige, lebensmittelrelevante Moleküle und Verbindungen zu binden, zu unterscheiden und als komplexe Gerüche wahrzunehmen [16, 80, 96]. Dabei konnten *Malnic et al.* [97] zeigen, dass mehrere Geruchsstoffe von einem Rezeptor erkannt werden können, unterschiedliche ORs einen Geruchsstoff detektieren sowie die Erkennung verschiedener Geruchsstoffe durch unterschiedliche Kombinationen an Geruchsrezeptoren erfolgen kann. Basierend auf phylogenetischen Analysen und ihrer Nukleotidsequenz werden ORs in zwei Gruppen eingeteilt. Während Mitglieder der kleineren Klasse I der Geruchsrezeptoren hauptsächlich für die Detektion wasserlöslicher Geruchsstoffe verantwortlich sind [98], können Rezeptoren der Klasse II hydrophobe sowie volatile Substanzen aus der Luft wahrnehmen [16, 99].

SIGNALTRANSDUKTION VON GERUCHSREZEPTOREN Anders als bei der Klasse C von GPCRs, erfolgt die Bindung von Geruchsstoffen bei ORs (GPCRs der Klasse A) nicht über den N-Terminus, sondern direkt über die Transmembrandomäne, die eine hydrophobe intramembrane Pore formt, in der eine Interaktion von Agonist und Rezeptor stattfindet. Hierbei induziert die Bindung von Geruchsmolekülen eine Aktivierung eines trimeren G-Proteins, das sich aus den Untereinheiten $G_{\alpha_{olf}}$, β und γ zusammensetzt [100, 101] (Abb 1.3 B). Die daraus resultierende Konformationsänderung ermöglicht den Austausch des an die G_{α} -Untereinheit gebundenem GDP zu GTP und im Folgenden die Abspaltung des $\beta\gamma$ -Komplexes [100, 102]. $G_{\alpha_{olf}}$ aktiviert in seinem ungebundenen Zustand die membranständige Adenylatzyklase Typ III, welche die enzymatische Umwandlung von ATP zu cAMP katalysiert und so einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration bewirkt [80, 103, 104]. cAMP bindet daraufhin an CNG-Ionenkanäle (*engl.* Cyclic Nucleotide-gated Channels) [105], die zu einem Einstrom von Kalzium- und Natrium-Ionen aus dem Mukus in die Zilien und folglich zu einer Depolarisation der chemosensorischen Zellen führen [106-108]. Intrazelluläre Kalzium-Ionen aktivierten Kalzium-abhängige Chloridkanäle (CaCC; *engl.* Calcium-activated Chloride Channels), die in einem Ausstrom von Chlorid-Ionen aus der Zelle und somit in einer verstärkten Depolarisation der Zilienmembran resultieren [109-111]. Das daraus entstehende neuronale Aktionspotential wird schließlich über die Axone der olfaktorischen Neurone in den olfaktorischen Bulbus und weiter in den olfaktorischen Cortex geleitet [112, 113].

1.1.3 *Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) und Geschmacksrezeptoren (TAS1Rs) – GPCRs der Klasse C*

Die Klasse C der GPCRs umfasst fünf Subfamilien, gebildet aus zwei GABA_B-Rezeptoren (*engl.* gamma-aminobutyric acid) (GABA_{B1} und GABA_{B2}), dem kalziumsensitiven Rezeptor (CaSR), drei Geschmacksrezeptoren (TAS1R1-TAS1R3), acht metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR1-8) sowie Orphan-Rezeptoren, die bei zahlreichen physiologischen Prozessen wie dem Geschmacksempfinden, der Calcium-Homöostase und der synaptischen Übertragung bzw. Weiterleitung eine entscheidende Rolle spielen [3, 114, 115]. Sie zeichnet sich durch ihre große N-terminale extrazelluläre VFT-Domäne aus, die die Bindungsstelle für Agonisten enthält. Kristallstrukturen von mGluRs offenbarten einen zweigliedrigen Aufbau, der es der VFT-Domäne erlaubt, eine offene und geschlossene Konformation anzunehmen, wobei die Bindung des Agonisten Glutamat die geschlossene Konformation und somit die aktive Form des Rezeptors stabilisiert [116, 117]. Eine zweite, cysteinreiche Domäne (CRD), die neun konservierte Cysteine enthält [117, 118] und in GABA_B-Rezeptoren nicht vorhanden ist [119], verbindet die VFT-Domäne mit den sieben Transmembranhelices [120, 121]. Diese charakteristischen Merkmale erlauben es den Klasse C GPCRs, sich zu konstitutiven dimeren Komplexen zusammenzuschließen, die für die Aktivierung von G-Proteinen und der daraus resultierenden Signalübertragung erforderlich sind, um ihre vielfältigen zellulären Funktionen zu erfüllen [120, 122-124].

1.1.3.1 Die Familie der metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs)

Die metabotropen Glutamatrezeptoren waren innerhalb der Klasse C GPCRs die ersten, welche von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen kloniert werden konnten [125, 126]. Aktiviert durch Glutamat, dem wesentlichen exzitatorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) [127] und gleichzeitig der am häufigsten vorkommenden intrazellulären Aminosäure [128], sind mGluRs in erster Linie an der Regulation der synaptischen Übertragung und neuronalen Anregung bzw. Weiterleitung beteiligt [114, 129]. Im ZNS werden sie von Neuronen und Gliazellen exprimiert und modulieren in der Nähe des synaptischen Spalts die Wirkung und Freisetzung von Glutamat und weiteren Neurotransmittern [130] (Abb. 1.4 A). Basierend auf ihrer Sequenzhomologie, unterschiedlicher G-Protein-vermittelter Signalwege sowie Pharmakologie, setzen sich die bekannten acht Rezeptoren (mGluR1-8) aus drei Untergruppen zusammen [120, 131]. Dabei zeigen mGluRs derselben Gruppe eine Sequenzidentität von 70 %, während zwischen den Gruppen eine Identität von etwa 45 % erreicht wird [132].

SIGNALTRANSDUKTION VON MGLU-REZEPTOREN

Gruppe I umfasst die Rezeptoren mGluR1 und mGluR5, die sich hauptsächlich an Post-Synapsen befinden und dort für die neuronale Erregbarkeit durch Depolarisation der Zellen verantwortlich sind [114, 120] (Abb. 1.4

A). In Folge der Rezeptorbindung von Glutamat kommt es durch Umwandlung von GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP (Guanosintriphosphat) zu einer Aktivierung des $G_{\alpha q/\alpha 11}$ -Proteins und daraus resultierend zu einer Abspaltung des $G_{\beta\gamma}$ -Dimers. Die G_{α} -Untereinheit aktiviert in ihrer GTP-gebundenen Form die Phospholipase C (PLC), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP_2) in Diacyl-Glycerol (DAG), gebunden an die Plasmamembran, und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP_3) katalysiert (Abb. 1.4 B). IP_3 gelangt ins Zytoplasma, wo es mit den, am endoplasmatischen Retikulum befindlichen IP_3 Rezeptoren (IP_3R) interagiert. Die daraus resultierende Freisetzung von Kalzium (Ca^{2+}) aktiviert eine Protein-kinase C (PKC), welche schließlich zur Aktivierung weiterer downstream Pathways führt [114, 133, 134]. Über $G_{\alpha s}$ -Kopplung können mGluR1 und mGluR5 darüber hinaus zusätzlich die membrangebundene Adenylatzyklase aktivieren und so zu einer erhöhten Konzentration von zyklischem AMP (Adenosinmonophosphat) (cAMP) beitragen [134] (Abb. 1.4 B).

Anders als mGluR1 und mGluR5 sind die Gruppen II (mGluR2 und mGluR3) und III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) der metabotropen Glutamatrezeptoren an eine $G_{\alpha i/o}$ -Untereinheit gekoppelt. Im zentralen Nervensystem sind diese GPCRs, mit Ausnahme des retinaspezifischen mGluR6 [135, 136], sowohl an den Prä- als auch Postsynapsen lokalisiert, wo sie vorwiegend die neuronale Erregbarkeit durch Hemmung von Neurotransmitterfreisetzungen herunterregulieren. Dabei leiten sie nach Aktivierung ihr Signal über die Inhibition der Adenylatzyklase und der daraus resultierenden cAMP-Bildung weiter (Abb. 1.4 B) [114, 120, 133]. Zudem moduliert die bei Aktivierung freigesetzte, heterodimere $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit Ionenkanäle, indem sie beispielsweise spannungsabhängige Kalziumkanäle (VDCC (*voltage-dependent Calcium-channels*)) hemmt und gleichzeitig durch Bindung an G-Protein aktivierte einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle (GIRK) einen Kalium-Ausstrom und somit eine Hyperpolarisation der Membran hervorruft [133, 137-139].

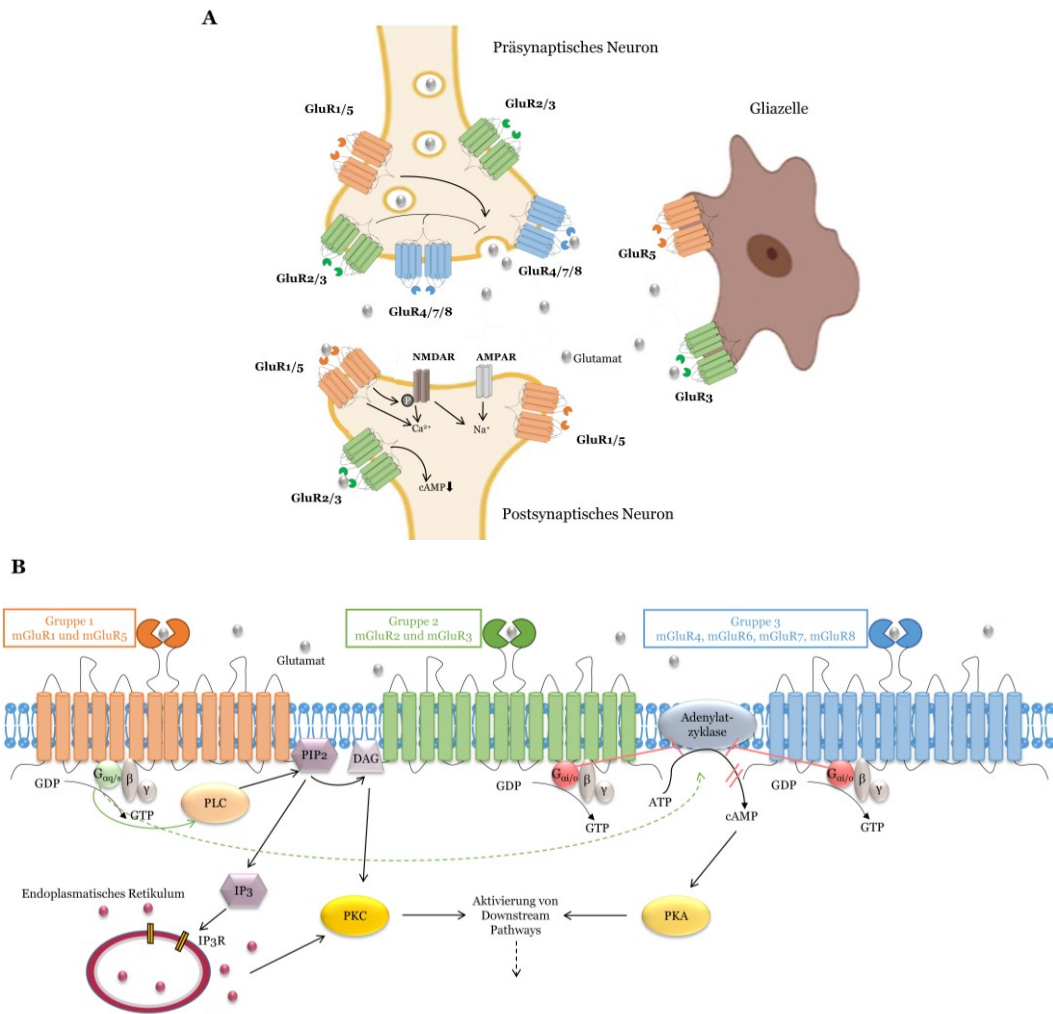


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der verschiedenen Gruppen metabotroper Glutamaterezeptoren auf Prä- und Postsynapsen und derer Signaltransduktionswege nach Aktivierung mit ihrem Ligan- den Glutamat. A: Schematische Verteilung von mGluRs an einer Synapse. Gruppe I der mGluRs (mGluR1/5) (orange) ist hauptsächlich auf postsynaptischen Neuronen zu finden, mit geringer Expression auf Präsynapsen. Die mGluRs der Gruppen II und III (mGluR 2/3 (grün) bzw. mGluR 4/7/8 (blau)) sind im Allgemeinen präsynaptisch lokalisiert, wo sie die Freisetzung von Gluta- mat inhibieren (graue Kreise). Wenn vorhanden, aktivieren Rezeptoren der Gruppe I hier die Freisetzung des Neurotransmitters. Postsynaptisch reagieren die AMPA- (α -Amino-3-hydroxy- 5-methyl-4-isoxazol-propionsäure) und NMDA- (N-Methyl-D-Aspartat) Rezeptoren auf Gluta- mat mit erhöhter intrazellulärer Kalzium- bzw. Natriumfreisetzung, die die Erregbarkeit der Zellen fördern, während mGluR2/3 durch Reduktion der cAMP-Produktion diese inhibiert. Auf Gliazellen werden mGluR3 und mGluR5 exprimiert, deren Signalling und Funktion jedoch noch nicht vollständig verstanden sind [140]. Abbildung modifiziert nach Srivastava et al. (2020) [141]. B: Gezeigt sind die Pathways über die Phospholipase C (PLC) und die Adenylatzyklase. Nach Bindung von Glutamat an die Gruppe I der metabotropen Glutamaterezeptoren kommt es durch Umwandlung von GDP zu GTP zur Aktivierung und Dissoziation der $G_{\alpha q/11}$ -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex und zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC), welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP₂) in Diacyl-Glycerol (DAG), gebunden an die Plasma- membran, und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP₃) katalysiert. IP₃ bindet an seinen IP₃-Rezeptor am endoplasmatischen Retikulum, wodurch es zur Freisetzung von Kalzium ins Zytosol und zur Stimulation der Proteinkinase C (PKC) kommt, die zur Aktivierung weitere Downstream Pa- thways führt. Die Gruppen II und III der mGluRs sind über eine $G_{\alpha i/o}$ Untereinheit gekoppelt, die nach Aktivie- rung die Adenylatzyklase und im Folgenden die cAMP-Bildung inhibiert und dadurch die neuro- nale Erregbarkeit herunterreguliert. Der freigesetzte $\beta\gamma$ -Komplex hemmt zudem spannungsab- hängige Kalziumkanäle (VDCC) und führt durch Bindung an G-Protein aktivierte einwärts gerichtete K^+ -Kanäle (GIRK) einen Kalium-Ausstrom herbei, der zu einer Hyperpolarisa- tion der Membran führt. Abbildung modifiziert nach Eddy et al. (2022) [133].

STANDARDMODELL DES GDP/GTP ZYKLUS ZUR REGULATION DES GPCR SIGNALLING Die zelluläre Signalübertragung erfolgt über ein hoch komplexes Zusammenspiel von einer Vielzahl an Proteinen, Peptiden und Ionen, die einen Informationsfluss innerhalb der Zellen bzw. an benachbarte oder entfernte Zellen ermöglichen. So gewährleistet beispielsweise die Freisetzung von Neurotransmittern am synaptischen Spalt die Signalweiterleitung an Neurone, Muskelzellen und endokrine Zellen und ist darüber hinaus an autokrinen Rückkopplungssignalen an das Neuron beteiligt [142]. Dabei regulieren Kinasen, Phosphatasen, Proteasen und nukleotidbindende Proteine präzise die Dauer und Intensität des intrazellulären Signals, indem sie zwischen einem aktiven und passiven Zustand hin- und herwechseln und auf diese Weise eine Überstimulation der Zellen verhindern [142].

G_{α} - (Guanin-Nukleotid-bindenden) Proteine von GPCRs besitzen eine GTPase Aktivität, die einen permanenten aktiv-inaktiv-Zyklus der Rezeptoren steuern und initiieren (Abb. 1.5). Dieser beginnt mit der Bindung eines Agonisten an den GPCR, der zu dessen erhöhter GEF-Aktivität (*engl.* guanine-nucleotide exchange factor) und in Folge dessen zur Freisetzung von GDP und der Bindung von GTP an die G_{α} -Untereinheit führt. Die daraus resultierenden Konformationsänderungen in den drei sogenannten „switch“-Regionen des G_{α} -Proteins erlauben die Dissoziation von $G_{\beta\gamma}$. Beide Untereinheiten sind daraufhin in der Lage, abhängig vom jeweiligen GPCR, 'downstream' Signale durch Interaktion mit nachgeschalteten Effektorproteinen auszulösen. Die bereits erwähnte intrinsische GTPase-Aktivität des G_{α} -Proteins hydrolysiert unter Freisetzung eines Phosphats (P_i) GTP zu GDP, welche durch GAPs (*engl.* GTPase-accelerating proteins) wie beispielsweise RGS (*engl.* Regulator of G-protein Signaling) verstärkt wird, woraufhin der Rezeptor in seinen Ruhezustand zurückgeführt wird [142-145].

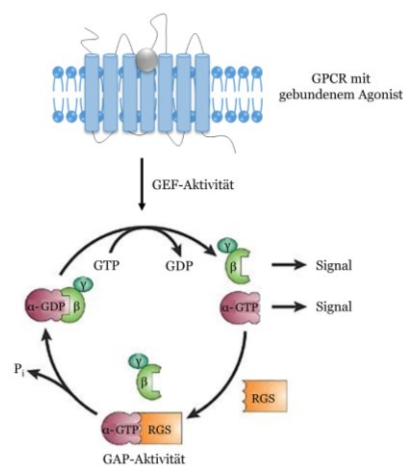


Abbildung 1.5: Standardmodell des GDP/GTP Zyklus zur Regulation des GPCR Signalling. Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor führt zu dessen erhöhter GEF-Aktivität und folglich zum Austausch von GDP zu GTP an der G_{α} -Untereinheit, deren Konformationsänderung die Freisetzung des $G_{\beta\gamma}$ -Dimers erlaubt. Abhängig vom jeweiligen GPCR tragen beide Untereinheiten zu spezifischen downstream Signalweiterleitungen bei. Die intrinsische GTPase-Aktivität des G_{α} -Proteins hydrolysiert durch Interaktion mit RGS GTP in GDP und schaltet dadurch den GPCR vom aktiven in den inaktiven Zustand. Abbildung modifiziert nach Neubig et al. (2002) [143].

1.1.3.2 Die Familie der TAS1-Geschmacksrezeptoren (TAS1Rs)

Der Geschmackssinn ermöglicht vor Verzehr von Lebensmitteln die Wahrnehmung einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer Stoffe und kann basierend auf den Geschmacksqualitäten in fünf grundlegende Empfindungen, süß, umami, bitter, sauer und salzig unterteilt werden, die eine qualitative Beurteilung potentieller Nahrungsmittel gewährleisten [146, 147]. So deutet der appetitanregende Geschmack nach Süße bzw. Umami (dem Geschmack nach Glutamat) auf kohlenhydrat- bzw. proteinreiche Nahrung mit hohem Energiegehalt hin, während eine salzige Geschmacksqualität einen Hinweis auf die Anwesenheit von Natrium in der Nahrung liefert, die zur Regulation des Elektrolythaushalts beiträgt. Ein bitterer bzw. saurer Geschmack löst dahingegen in der Regel ein aversives Verhalten aus und deutet auf das Vorhandensein potentieller Toxine, starker Säuren und verdorbener Lebensmitteln hin [148, 149]. Aktuelle Studien über den Geschmack von Fett weisen darüber hinaus auf eine mögliche, unabhängige sechste Geschmacksqualität hin [150-154].

Abhängig von den jeweiligen Geschmacksqualitäten findet die Geschmackswahrnehmung und deren damit verbundene Signaltransduktion über verschiedene Ionenkanäle bzw. Rezeptoren statt. Während der Geschmack von sauer und salzig über apikal lokalisierte Ionenkanäle erfolgt, wird das Empfinden nach Süßem, Bitterem bzw. Umami über GPCRs der Klasse C vermittelt [155-160], welche sich in zwei Gruppen einteilen lassen: Die Familie der Geschmacksrezeptoren des Typ 1 (TAS1Rs) besteht aus drei Rezeptorproteinen, TAS1R1-TAS1R3, die durch Formierung von Heterodimeren den Süß- (TAS1R2/TAS1R3) und Umamirezeptor (TAS1R1/TAS1R3) bilden [158-164]. Im Gegensatz dazu ist die Familie der TAS2Rs für den Bittergeschmack verantwortlich, die mit Hilfe von 25 verschiedenen GPCRs auf ein breites Spektrum aversiver bzw. toxischer Substanzen reagieren [162, 165].

DIE GESCHMACKSWAHRNEHMUNG AUF ZELLULÄRENER EBENE Die Wahrnehmung gustatorischer Reize erfolgt mit Hilfe von Sinneszellen, den Geschmackspapillen und -knospen, in deren Membran sich die Geschmacksrezeptoren befinden [75, 166]. Morphologisch gesehen, lassen sich die Papillen in drei Formen einteilen (Abb. 1.6 A): Pilzpapillen (*Papillae fungiformes*) bilden zahlenmäßig die größte Gruppe und sind hauptsächlich an der Zungenspitze zu finden. Ihr Epithel ist an der Oberseite mit Geschmacksknospen ausgekleidet. Die Blätterpapillen (*Papillae folliatae*) hingegen befinden sich an den Seitenflächen im hinteren Zungenkörper und bestehen aus Schleimhautfalten, die mittels Furchen voneinander abgetrennt sind. An deren Böden befinden sich seröse Spüldrüsen, die sogenannten Ebner-Drüsen, deren Sekret die Geschmacksknospen reinigt und somit eine schnelle Reaktion der Geschmacksknospen auf unterschiedliche Reize gewährleistet. Die größten Geschmackspapillen stellen die Wallpapillen (*Papillae circumvallate*) an der Zungenwurzel dar, die analog zu den Blätterpapillen mit mehreren Geschmacksknospen sowie Ebner-Drüsen ausgestattet sind [75, 167, 168].

Die Geschmacksknospen, von denen der Mensch 2000-5000 besitzt, repräsentieren die Hauptorgane der chemosensorischen Erkennung. Jede einzelne enthält 50-100 Geschmackszellen und ist mit afferenten Nervenfasern verschaltet (Abb. 1.6 B) [169]. Die Geschmackszellen lassen sich in drei verschiedene Typen (I-III) unterteilen [149]. Typ I- oder gliaähnliche Zellen sind Stützzellen, die den Zellen von Typ II und III Halt geben. Zudem sind sie durch Expression einer ecto-ATPase für den Abbau der von Geschmackszellen freigesetzten Transmitter verantwortlich [169, 170]. Bei den Typ II-(Rezeptor)-Zellen handelt es sich um die Zellen, die für den Geschmack von süß, bitter und umami verantwortlichen GPCRs sowie deren Effektorproteine zur Weiterleitung von Geschmacksqualitäten exprimieren [149, 169] (Abb. 1.6 B, orangene Zellen). Dabei reagiert jede Rezeptorzelle auf eine bestimmte Geschmacksqualität [171, 172]. An ihren apikalen Enden befinden sich Mikrovilli, über die die Zellen durch eine Geschmackspore Kontakt zur Mundhöhle und den im Speichel gelösten Geschmacksstoffen aufnehmen. Diese Zellen besitzen keine synaptischen Verbindungen, sondern leiten durch Freisetzung von ATP das mittels GPCRs entstandene Rezeptorpotential über Pan-nexin 1-Kanäle an sensorisch afferente Fasern und benachbarte präsynaptische Geschmackszellen (Typ III) weiter [169, 173, 174]. Typ III-Zellen, auch präsynaptische Zellen genannt, besitzen Synapsen und exprimieren Proteine wie SNAP 25 und spannungsabhängige Kalzium-Kanäle, die mit der synaptischen Übertragung und Ausschüttung von Neurotransmittern assoziiert sind [149, 169]. Durch Zell-Zell-Kommunikationen innerhalb der Geschmacksknospe kommt es in Folge der Rezeptor-vermittelten ATP-Ausschüttung neben der Erregung afferenter Nervenfasern zur Stimulation der Typ III-Zellen, die unabhängig von den Geschmacksqualitäten zusätzlich das empfangene Signal auf Nervenfasern übertragen, über die der Stimulus in den gustatorischen Cortex des Gehirns weitergeleitet wird und eine Geschmacksempfindung erfolgt [149, 169].

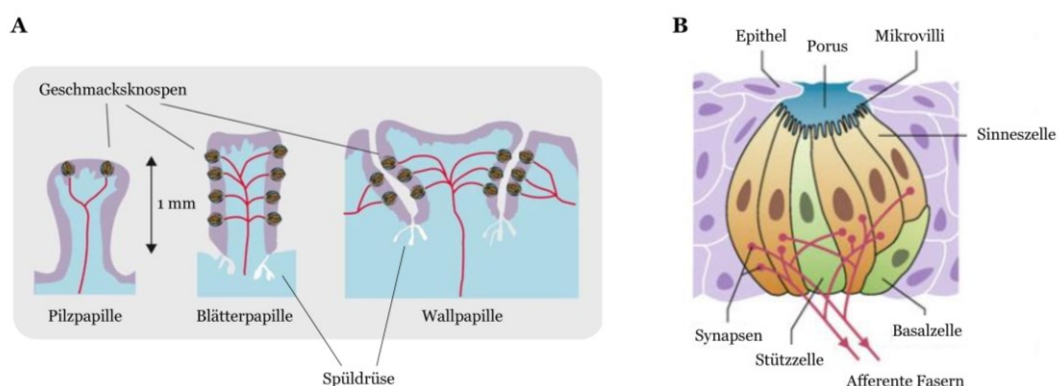


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung verschiedener Geschmackspapillen auf der Zunge sowie des Aufbaus einer Geschmacksknospe. Abbildung modifiziert nach Vilgis (2015) [167] und Hatt (2010) [75].

DIE GESCHMACKSWAHRNEHMUNG AUF MOLEKULARER EBENE Analog zu den metabotropen Glutamatrezeptoren erfolgt bei den TAS1Rs die Bindung von Zuckern, künstlichen Süßungsmitteln und Aminosäuren hauptsächlich mit Hilfe der VFT-Domäne. Dabei weist das Süßrezeptordimer ein breites Ligandenspektrum auf, das von Mono- und Disacchariden wie Saccharose, Fruktose und Glukose, über D-Aminosäuren, darunter D-Alanin, D-Histidin, D-Phenylalanin und D-Tryptophan, bis hin zu Proteinen (Monellin, Brazzein) und künstlichen Süßstoffen (Sukralose, Saccharin, Acesulfam K, Cyclamat) reicht [158-160, 175] (Abb. 1.7). Einige Süßstoffe bzw. Proteine zeigen bei Interaktion mit dem Rezeptor abweichende Bindungsverhalten, indem sie, im Falle des Brazzein und Monellin, mit der N-terminalen Linkerregion [175-177], bzw. der Transmembrandomäne interagieren, wie es auf Lactisol und Cyclamat zutrifft [163].

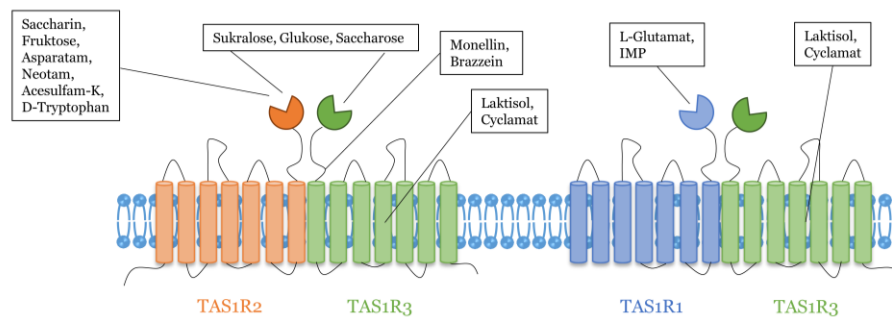


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Geschmacksrezeptoren des Typ 1 (TAS1Rs) und ihrer Ligandenbindungsstellen. Dargestellt sind die Rezeptoren des Süß – (TAS1R2/TAS1R3) und Umamirezeptordimers (TAS1R1/TAS1R3) mit ihren jeweiligen Bindestellen für unterschiedliche Zucker, Süßstoffe und Aminosäuren. Abbildung modifiziert nach Behrens et al. (2011) [178] und Chéron et al. (2019) [179].

Im Gegensatz zum Süßrezeptor erfolgt die Bindung der bekannten spezifischen Agonisten des Umami-Rezeptors ausschließlich über die VFT-Domäne des TAS1R1-Rezeptors [158, 160]. Dabei wird die Erkennung von L-Aminosäuren, wie bspw. L-Glutamat, und infolgedessen der Umamigeschmack durch freie Nukleotide wie Inosin-5-Monophosphat (IMP) bzw. Guanosin-5-Monophosphat (GMP), die ebenfalls in der Nahrung vorkommen, potenziert [160]. IMP bzw. GMP binden dabei innerhalb der VFT-Domäne an andere Bindungsstellen wie das Glutamat, sodass es nach dessen Bindung zu einer Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation und daraus resultierend zu einem positiven allosterischen Modulationseffekt kommt [121, 180, 181].

Die Ergebnisse einer Studie von Damak et al. [182], die in TAS1R3-defizienten Mäusen ein geringeres, jedoch nicht vollständig ausbleibendes Verhalten gegenüber Zuckern und Glutamat beobachten konnte, führten zur Hypothese von weiteren, am Umamigeschmack beteiligter Rezeptoren [183-185]. So konnten im Zungengewebe zusätzliche Aminosäurerezeptoren,

wie die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 -4 (mGluR1 - mGluR4) [186-189] und der Kalziumrezeptor (CaS) [190, 191] identifiziert werden, deren Rolle bei der Geschmackswahrnehmung jedoch noch unbekannt ist.

SIGNALTRANSDUKTION VON TAS1-REZEPTOREN Analog zu den metabotropen Glutamatrezeptoren besitzen die GPCRs der TAS1R-Familie ein intrazellulär gekoppeltes trimeres G-Protein, das sich in diesem Fall aus den Untereinheiten α -Gustducin [192, 193], β_3 und γ_{13} [194] zusammensetzt (Abb. 1.8). Nach Bindung eines Liganden erfolgt an der α -Untereinheit der Austausch von GDP zu GTP und infolgedessen eine Aktivierung und Dissoziation vom $G_{\beta\gamma}$ -Dimer. Der $\beta\gamma$ -Komplex aktiviert daraufhin eine Phospholipase C β_2 (PLC β_2) [195], welche die Spaltung von PIP₂ in DAG und IP₃ induziert, woraufhin es durch Bindung von IP₃ an IP₃-Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum zur Freisetzung von Kalzium ins Zytosol kommt [147, 196-198]. Daraus resultiert eine Aktivierung des TRPM5 (*transient receptor potential, melastatin family member 5*)-Kanals und folglich ein Einstrom monovalenter Ionen, insbesondere von Natrium (Na⁺) [199-202]. Der Influx positiv geladener Ionen und die erhöhte intrazelluläre Konzentration positiv geladenem Kalziums führen zur Depolarisation des zellulären Membranpotentials, der Aktivierung von VGNC (voltage-gated Na⁺ channels) [198] und der Bildung eines Aktionspotentials, das die Freisetzung von ATP durch CALHM1/3 (*engl. Calcium Homeostasis Modulator 1/3*) bzw. Pannexin-1 Kanäle bewirkt [173, 203-205]. Schließlich überträgt ATP das Signal auf ionotrope purinerge Rezeptoren P2X₂ und P2X₃ auf afferenten Nervenfasern, über die der Stimulus in den gustatorischen Cortex des Gehirns weitergeleitet wird und eine Geschmacksempfindung erfolgt [174, 206].

Parallel dazu aktiviert die dissoziierte Untereinheit α -Gustducin eine geschmacksspezifische Phosphodiesterase (PDE) und initiiert dadurch den Abbau von cAMP in AMP [207, 208]. Die Aufrechterhaltung niedriger Konzentrationen an cAMP verhindert die cAMP-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), die durch Phosphorylierung die PLC β_2 inhibieren und zu einem reduzierten intrazellulären Kalziumgehalt führen würde. α -Gustducin trägt somit zur Gewährleistung einer optimalen Ca²⁺-Konzentration und folglich zu einer Regulation der Signalweiterleitung bei Bindung eines Liganden bei bzw. ermöglicht im Anschluss eine schnelle Abschaltung der Signaltransduktion [208, 209].

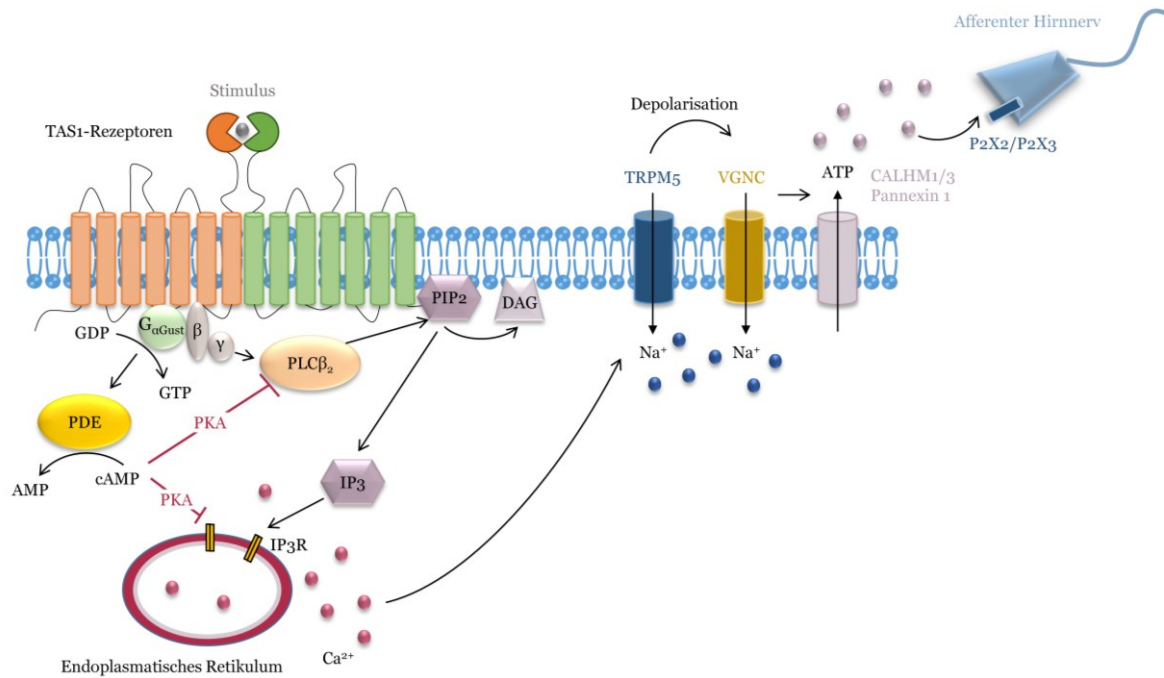


Abbildung 1.8: Signaltransduktion von TAS1-Rezeptoren im Zungengewebe. Nach Bindung eines Liganden an das Heterodimer TAS1R1/TAS1R3 bzw. TAS1R2/TAS1R3 kommt es durch Umwandlung von GDP zu GTP zur Aktivierung und Dissoziation des trimeren G-Proteins. Die $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert die Phospholipase C β 2 (PLC β 2), die die Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP $_2$) in Diacyl-Glycerol (DAG) und Inositol 1,4,5-Triphosphat (IP $_3$) katalysiert. IP $_3$ bindet an den IP $_3$ -Rezeptor (IP $_3$ R) am endoplasmatischen Retikulum und führt so zur Freisetzung von Kalzium ins Zytosol, das den TRPM5 (transient receptor potential, melastatin family member 5)-Kanal aktiviert, Natrium in die Zelle einströmt und eine Depolarisation der Zelle entsteht. Voltage-gated Na $^+$ channels (VGNC) öffnen sich, weiteres Natrium gelangt ins Zellinnere. Unter Bildung eines Aktionspotentials wird über CALHM1/3 bzw. Pannexin-1 Kanäle ATP freigesetzt, das an ionotrope purinerge Rezeptoren P2X2 und P2X3 auf afferenten Nervenfasern bindet, über die der Stimulus in den gustatorischen Cortex des Gehirns weitergeleitet und eine Geschmacksempfindung erfolgt. α -Gustducin bewirkt durch Aktivierung der Phosphodiesterase (PDE) die Regulation der Signalweiterleitung, indem sie die intrazellulären cAMP-Level aufrechterhält und so eine für die Signaltransduktion optimalen Ca $^{2+}$ -Konzentrationen gewährleistet. Abbildung modifiziert nach Kinnamon et al. 2009 [209] und Luddi et al. 2019 [210].

1.2 Chemosensorische GPCRs im Immunsystem und darüber hinaus

Innerhalb der letzten 25-30 Jahre fand auf dem Gebiet der chemosensorischen Rezeptorforschung ein Paradigmenwechsel statt. Während sich bis dato die Annahme einer uneingeschränkten Expression von Geruchs- und Geschmacksrezeptoren in der Nasenhöhle bzw. im Mundraum hielt, konnte durch zahlreiche veröffentlichte Studien, zunächst auf RNA- und später auf Protein- und funktioneller Ebene, belegt werden, dass diese GPCRs und ihre Signalproteine in zahlreichen Zellen und Organen des Körpers vorzufinden sind, wo sie zusätzliche, fundamentale Funktionen übernehmen, die weit über die Wahrnehmung von Gerüchen und Geschmacksstoffen hinausgehen. Dabei wurde diese Art der Expression zunächst als Fehlregulation betrachtet und daher als „ektopische“ Expression bezeichnet, was per Definition „eine anormale Lage oder Position innerhalb des Körpers“ bedeutet [211, 212].

Mit weit über 100 verschiedenen GPCRs an ihrer Oberfläche, darunter Chemokin- [213, 214], Formyl-Peptid- [215-217], Komplement- [218, 219], freie Fettsäure- [220, 221], aber auch Geruchs- [222-225], Geschmacks- [222, 224, 226-228] und metabotrope Glutamatrezeptoren [229-233], scheinen die Blutleukozyten, auch weiße Blutzellen genannt, eine bedeutsame zelluläre Lokalisation dieser Rezeptoren darzustellen, mit Hilfe derer es den Immunzellen gelingt, Krankheitserreger aufzuspüren, zum Ort der Verletzung bzw. Infektion zu gelangen und Immunreaktionen zu koordinieren [212]. In Abhängigkeit ihres Zelltyps, Aktivierungsstatus, Lokalität im menschlichen Körper sowie Infektions- bzw. Entzündungsstadiums nehmen Leukozyten über ihre GPCRs eine Vielzahl an unterschiedlichsten Molekülen und Verbindungen, darunter Peptide, Nukleotide und Proteine wahr, die als chemische Lockstoffe (*engl.* chemoattractants) deren Zell-Zell-Interaktion, Motilität, Migration und Chemotaxis regulieren und nach Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor intrazelluläre, promigratorische Prozesse induzieren, um ihre spezifischen Effektorfunktionen im Körper zu erfüllen [234-236]. Dabei beschränkt sich die Funktionalität und der Beitrag von GPCRs an immunologischen Prozessen nicht ausschließlich auf einen bestimmten Zelltyp innerhalb der Blutleukozyten. Vielmehr lässt sich deren Expression auf einer Vielzahl unterschiedlichster Leukozyten, wie den Monozyten [237, 238], dendritischen Zellen [239, 240], natürlichen Killerzellen [241, 242], polymorphkernigen Leukozyten (Neutrophile, PMNs) [234, 243], B- [244, 245] und T-Zellen [234, 246] vorfinden, die sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem umfassen. Die vorliegende Arbeit befasst sich in erster Linie mit zwei verschiedenen zellulären Untergruppen der Blutleukozyten, den PMNs und T-Zellen, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

1.2.1 Polymorphkernige Leukozyten (Neutrophile) – Zellen des innate Immunsystems

Die Zellen des humanen Immunsystems entstammen alle einer gemeinsamen Vorläuferzelle, den hämatopoetischen Stammzellen, aus der sich durch Differenzierung zwei, die myeloide und lymphoide umfassende, Zelllinien mit spezialisierten Zelltypen für unspezifische bzw. spezifische Immunantworten entwickeln [247, 248]. Die myeloide Linie beinhaltet mit Makrophagen, dendritischen Zellen und Neutrophilen Zellen des innate, angeborenem Immunsystems, während die lymphoiden Zellen mit B-, T- und natürlichen Killerzellen weitestgehend das adaptive, erworbene Immunsystem abbilden und für die Unterscheidung zwischen fremden und nicht-fremden Antigenen sowie der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses verantwortlich sind [249].

Bei Neutrophilen handelt es sich um kurzlebige, endständig differenzierte weiße Blutzellen, die mit 50-70 % den größten Anteil der peripheren humanen Leukozyten einnehmen [250]. Als essentielle, phagozytäre Effektorzellen des innate Immunsystems bilden sie die erste Verteidigungslinie gegen die Besiedlung von Pathogenen, insbesondere von Bakterien und Pilzen [234] und sind zudem an der Eindämmung bzw. Auflösung von Entzündungsprozessen, der Wundheilung sowie Aufrechterhaltung der Gewebemöostase beteiligt [243, 251]. Ausgestattet mit einer Vielzahl an Granula und sekretorischen Vesikeln [252, 253] erfolgt die Beseitigung von Mikroorganismen über mehrere Schritte – der Fusion (Phagozytose) mit dem Erreger, der Freisetzung von zytotoxischen, mikrobiziden Proteinen, Peptiden und Enzymen enthaltenden Granula [254] und der Aktivierung einer membrangebundenen NADPH-Oxidase, die zur Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und radikalen Sauerstoffspezies (ROS) führt [250].

Die Bildung von Neutrophilen beginnt im Knochenmark mit kontinuierlicher Freisetzung in den Blutkreislauf, wo sie im Ruhezustand intravaskuläre Kompartimente überwachen und die Homöostase aufrechterhalten [234, 243]. Nach Konfrontation mit Entzündungsmediatoren wie Zytokinen, Chemokinen, pathogen-stämmigen Molekülen sowie mechanischem Stress [255] entwickeln die Zellen einen aktiven, geprägten Phänotyp, der zu einer erhöhten Degranulation, Phagozytose, ROS-Produktion und der Bildung von NETs (*engl.* Neutrophil extracellular traps), extrazellulären, netzartigen Strukturen, bestehend aus DNA und granulären Proteinen [256, 257], führt [243]. Je nach Stimulus behalten die Zellen ihren aktiven Phänotyp bei oder wandeln sich vollständig in ihren Ruhezustand zurück, was die hohe Plastizität von Leukozyten verdeutlicht [243]. Einhergehend mit deren Aktivierung in Antwort auf Infektionen und Entzündungen kommt es innerhalb von Minuten zu einer erhöhten Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark und einer effizienten, präzisen Infiltration in entzündetes Gewebe [234, 258]. Dabei durchlaufen Neutrophile aufeinanderfolgende, hoch-koordinierte

nierte Prozesse der Chemotaxis, die von der Erkennung eines Gradienten, über die Zellpolarisierung, der Zytoskelett-Formierung bis hin zur Zellmotilität und Zellcluster-Bildung, die Allgemein auch als „Swarming“ (englische Bezeichnung für Schwärmen) bezeichnet wird [259, 260], reichen [234, 258].

Sowohl die Aktivierung als auch die Migration neutrophiler Leukozyten umfasst ein komplexes Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Proteasen und ihrer Rezeptoren, unter denen die GPCRs eine zentrale Rolle einzunehmen scheinen [243]. Mit über 30 unterschiedlichen, an der Zelloberfläche exprimierten GPCRs, die alle chemotaktische Moleküle binden können, sind diese Rezeptoren dazu befähigt, auf ein breites Spektrum diverser inflammatorischer Stimuli zu reagieren [234, 261, 262]. Jedoch ist nach wie vor weitestgehend unbekannt, in wieweit die jeweiligen GPCRs unterschiedlicher Klassen bzw. Familien miteinander interagieren bzw. kompetitiv die zelluläre Migration sowie Funktionalität von Neutrophilen regulieren [243]. Klar ist, dass diese Rezeptoren diverse Mechanismen aufweisen, um auf die Fülle an gleichzeitig oder nacheinander vorhandenen Stimuli zu reagieren, indem sie mittels kompetitivem Antagonismus, partiellem Agonismus, Rezeptormultimerisierung bzw. unterschiedlichen Reaktionen auf Agonisten aufgrund verschiedener nachgeschalteter intrazellulärer Pathways das Verhalten der Immunzellen kontrollieren [234]. Es bedarf jedoch weiterer Studien, um das gesamte funktionale Spektrum der Neutrophilen im Immunsystem sowie deren Rezeptoren vollständig aufzuklären und verstehen zu können.

1.2.2 T-Zellen – Zellen des adaptiven Immunsystems

Gemeinsam mit B-Zellen kennzeichnen die T-Zellen auf zellulärer Ebene das adaptive, erworbene Immunsystem. Dabei handelt es sich im Gegensatz zu Neutrophilen um langlebige Zellen, die während ihres gesamten Lebenszyklus sowohl vor, während und nach ihrer Aktivierung, als auch in ihrer Effektor- und Gedächtnisphase, welche eine schnelle Immunantwort nach Reinfektion gewährleistet, von GPCRs gesteuert, reguliert und funktionell beeinflusst werden [234, 246]. Als lymphatische Vorläuferzellen aus dem Knochenmark freigesetzt, wandern die T-Zell-Vorläufer in den namensgebenden Thymus (thymusabhängige (T-)Lymphozyten), wo sie einen stark regulierten, durch GPCRs vermittelten Entwicklungsprozess durchlaufen [234, 263], der mitunter die Ausbildung von T-Zell-Rezeptoren für die Erkennung eines spezifischen Antigens umfasst [264]. Ausgereifte T-Zellen verlassen den Thymus, gelangen in den Blutkreislauf und zirkulieren fortan zwischen Blut, Lymphgewebe und sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, und Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben) als naive T-Zellen [263]. Treffen sie dabei auf spezifische Antigene, die in Form eines Peptid-MHC-Komplexes auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, lokalisiert sind, kommt es zu einer Aktivierung und Differenzierung in T-Effektor-Zellen, einem Prozess, der auch als „Priming“ bezeichnet wird [263]. Eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung ist

dabei durch die Anwesenheit dreier, mitunter GPCRs-vermittelter Signale gegeben: a) der Interaktion des spezifischen T-Zell-Rezeptors mit dem entsprechenden Peptid auf der Antigen-präsentierenden Zelle, b) dem Signalling durch co-stimulierende Moleküle und c) der Beteiligung von Zytokinen, die die klonale Expansion einleiten [264]. In Folge der Aktivierung unterziehen sich die T-Zellen umfangreicher transkriptioneller Veränderungen, Proliferationen und Differenzierungen in Zellen, die von kurzlebigen Effektorzellen bis hin zu langlebigen Gedächtniszellen reichen [234, 246]. Dabei ändern sie ihr GPCR-Expressionsmuster und Bewegungsverhalten, um infizierte entzündete Gewebe zu erreichen, dort ihre spezifischen Effektorfunktionen ausführen und die mikrobielle Invasion kontrollieren zu können, bzw. um B-Zellen bei der Bildung pathogen-spezifischer Antikörper zu unterstützen [234, 263]. So konnten sogar differentielle Expressionsmuster der G_α-Untereinheiten in Gedächtnis- und naiven T-Zellen beobachtet werden [265].

Die Migration von T-Zellen erfolgt über einen hochkomplexen Prozess, den zahlreiche Faktoren, Stimuli, Immunzellen, GPCRs und andere Rezeptoren regulatorisch beeinflussen und koordinieren, darunter intrinsische T-Zell-Moleküle, die die Polarisierung, Ausstülpung und Bewegungsverhalten der Zellen regulieren, physikalische, durch Stromaelemente und der extrazellulären Umgebung gebildete Leitstrukturen, intrazelluläre Adhäsionskräfte und chemokinetische Signale [234, 266]. Jedoch gibt es bis heute nur wenige Studien, die die vielschichtige und multidimensionale GPCR-Interaktion in T-Zellen untersuchen bzw. weitgehend aufklären konnten. Bekannt ist, dass Prozesse wie Chemokinese und Chemotaxis sowie homologe und heterologe Desensibilisierungen bei GPCR-vermittelten T-Zell-Funktionen eine wesentliche Rolle zu spielen scheinen. Jedoch sind die denen zugrundeliegenden Mechanismen, Zusammenhänge und gegenseitige Beeinflussung bzw. Wechselbeziehungen verschiedener Rezeptoren in diesen Zellen noch nahezu gänzlich unbekannt [234].

Trotz intensiver Forschung in den vergangenen Jahren, hauptsächlich in GPCR-defizienten Mäusen, bleibt die Komplexität, sowohl hinsichtlich der Interaktion verschiedener GPCRs als auch in Bezug auf die Signalverarbeitung von Immunzellen, des innaten als auch adaptiven Immunsystems weitgehend ungeklärt. So sind in der Regel mehrere GPCRs gleichzeitig oder nacheinander an Migrations- bzw. Interaktionsprozessen beteiligt, welche einerseits synergistisch auf bestimmte Signale reagieren, häufig jedoch gegenteilige Reaktionen als Antwort auf ein bestimmtes Chemokin oder Zytokin auslösen können [234, 267]. Wie schaffen es Blutleukozyten trotz der Unmengen an unterschiedlichsten GPCR-Signalen und -stimuli aus verschiedensten Quellen effizient und zielgerichtet an den Ort der Entzündung bzw. Infektion zu navigieren, ohne blockiert, beeinflusst bzw. umgelenkt zu werden? Welche Rolle spielen synergistische bzw. antagonistische GPCR-Interaktionen? Funktioniert die GPCR-vermittelte Regu-

lation und Interaktion in allen Geweben und Organen des Körpers auf die gleiche Weise? Inwieweit sind GPCRs mit Krankheiten assoziiert? Welche Aufgaben besitzen GPCRs im Immunsystem, die normalerweise chemosensorische Funktionen im Körper übernehmen [234]? In den nachfolgenden Unterkapiteln werden bisher bekannte Funktionen „ektopisch“ exprimierter chemosensorischer GPCRs im Körper beleuchtet, wobei der Schwerpunkt auf deren potentiellen Aufgaben im Immunsystem gerichtet wird.

1.2.3 Extranasale Expression olfaktorischer Rezeptoren

Die ältesten Berichte über die „ektopische“ Expression von ORs stammen aus dem Jahre 1992 von *Parmentier et al.* [268], die das Vorhandensein von Geruchsrezeptoren in Spermazellen nachwiesen. In kurzem Abstand folgten weitere Studien. Sie bestätigen die Anwesenheit dieser Rezeptoren in Hoden und Keimzellen [269-271]. Ihnen wird hier eine Beteiligung an der Motilität und Chemotaxis von Spermien [271-273] sowie der Genexpressionsregulation in frühen Phasen der Befruchtung [274] zugeschrieben. Zusätzlich konnten mit der Niere und der Prostata weitere OR-enhaltende Organe des Genital- und Urinaltrakts identifiziert werden [275-279]. Neben den Geruchsrezeptoren wiesen *Pluznik et al.* [280] und *Kalbe et al.* [275] darüber hinaus die Anwesenheit von Proteinen der olfaktorischen Signalkaskade, G_{olf} und ACIII, in der Niere nach.

Im Herz-Kreislaufsystem und der Lunge werden Geruchsrezeptoren mit der Beteiligung an einer Vielzahl an Funktionen, wie der Angiogenese und Migration von Arterien und Endothelzellen [281], chronotropen Effekten auf das Herz [282] sowie der Kontraktilität von Muskelzellen der Lunge [283] in Verbindung gebracht. Zudem konnten sich durch zahlreiche Studien der Gastrointestinaltrakt und die dazugehörigen Organe wie Leber und Bauchspeicheldrüse als bedeutsame Schnittstelle zwischen hiesig angesiedelten Geruchsrezeptoren und Komponenten aus der Nahrung bzw. des Mikrobioms manifestieren [284-287]. So scheinen ORs im Darm eine Rolle bei der Serotonin-Sekretion [284] sowie der Glukosehomöostase während der Verdauung [285] zu spielen und darüber hinaus an der Glukagon- und Insulin-Sekretion im Pankreas [288, 289] bzw. metabolischen Prozessen, der Lipogenese und Gluconeogenese, in der Leber beteiligt zu sein [290-292]. In der Haut stehen Geruchsrezeptoren in Zusammenhang mit an der Wundheilung beteiligten Proliferation, Migration und Regeneration von Keratinozyten, [293, 294], der Homöostase von Melanozyten [295] sowie der Regulation von Haarwachstum [296] und werden zudem in Muskelzellen exprimiert [283, 297, 298].

Bezugnehmend auf das Immunsystem konnten OR-Transkripte und deren Signalproteine in zahlreichen humanen Blutzellen wie peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs), Erythrozyten, natürlichen Killerzellen, Neutrophilen sowie B- und T-Zellen nachgewiesen werden [212, 222-225]. Deren funktionales Spektrum ist jedoch bei weitem noch nicht aufgeklärt. So konnten *Li et al.* [299] nach Stimulation von murinen Lungenmakrophagen mit Interferon γ

und bakteriellem Lipopolysaccharin eine Hochregulation von insgesamt 8 OR-Transkripten nachweisen. Die gemeinsame Stimulation zusammen mit Oktanal, einem Modellagonisten, erhöhte zudem die Produktion von MCP-1 (*engl.* monocyte chemotactic protein) und die Motilität von Makrophagen, sodass davon ausgegangen wird, dass Geruchsrezeptoren durch Regulation der MCP-1-Produktion die Funktion von Makrophagen und deren Motilität regulieren [299]. Zudem konnten *Geithe et al.* [300] zeigen, dass Aromastoffe aus Butter, die *in vivo* spezifische ORs aktivieren, ein chemotaktisches, konzentrationsabhängiges Verhalten menschlicher Neutrophile induzieren, was auf eine GPCR-vermittelte Aktivierung von Blutleukozyten hindeuten könnte.

Neben den natürlichen Prozessen und Aufgaben im Körper werden differentiell exprimierte Geruchsrezeptoren jedoch auch mit pathologischen Veränderungen wie Krebs und neuropathologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [301]. Studien konnten zeigen, dass eine Herunterregulation bestimmter ORs im frontalen bzw. präfrontalen Cortex mit Parkinson [302] und chronischer Schizophrenie [303] in Zusammenhang stehen und eine Dysregulation dieser Rezeptoren eine Anfälligkeit für Alzheimer und der Kreuzfeld-Jakob-Krankheit begünstigen kann [304]. Zudem konnten einige Geruchsrezeptoren als potentielle Marker für bestimmte Krebsarten wie Prostata [277, 279, 305, 306], Darm [307, 308], Magen [309, 310], Brust [311] und Lunge [312, 313] identifiziert werden.

Aktuelle Studien über das SARS-CoV-2-Virus (*engl.* Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Type 2) weisen auf eine Co-Expression von ORs und Schlüsselmediatoren der SARS-CoV-2 Infektion in verschiedenen Geweben wie der Lunge oder der Prostata hin [314] und ziehen zudem eine mögliche Herunterregulation bestimmter olfaktorischer Rezeptorproteine in Betracht [315]. Jedoch sind zum jetzigen Zeitpunkt die biologische Funktion und funktionelle Relevanz extranasal exprimierter ORs sowohl im Zusammenhang mit dem SARS-CoV-2-Virus und pathologische Veränderungen als auch in Bezug auf die natürlich vorkommende Expression im menschlichen Körper noch unzureichend erforscht.

1.2.4 Ektopische Expression gustatorischer Rezeptoren (*TAS1Rs* und *mGluRs*)

EXTRAORALE EXPRESSION VON TAS1-REZEPTOREN Ähnlich den Geruchsrezeptoren werden Geschmacksrezeptoren der Familien 1 (*TAS1Rs*) und 2 (*TAS2Rs*) in einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen und Organe im menschlichen Körper exprimiert, in denen ihnen eine Reihe von bedeutsamen Aufgaben und Funktionen zugeschrieben werden [316]. Bezugnehmend auf die *TAS1*-Rezeptoren wird insbesondere *TAS1R3* mit der Beteiligung an einem breiten Spektrum zellulärer Prozesse in Verbindung gebracht, der, abhängig von der jeweiligen Lokalisierung, sowohl als Umami- bzw. Süßrezeptor als auch als Homodimer fungieren zu können scheint. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden wie der Immunhistochemie, RT-qPCR,

Western Blot und Kalzium-Imaging konnte der Gastrointestinaltrakt als einer der wesentlichen Expressionsorte der TAS1-Rezeptoren identifiziert werden. Mit der Beteiligung an Peptidsekretionen, welche durch endo- und exogene Nährstoffe stimuliert werden, scheint der Süßrezeptor in diesem Organsystem für die Kontrolle wichtiger Funktionen wie dem Stoffwechsel, der Verdauung und der Ernährung eine bedeutende Rolle zu spielen [317-328]. So wirkt er im Pankreas an der Glukose-induzierten Sekretion von Insulin in Antwort auf Nährstoffe mit, dessen Signalpathway über PLC und den TRPM5-Kanal erfolgt [317-319]. Im Magen-Darm-Trakt wird TAS1R2/TAS1R3 für eine erhöhte Expression des Natrium/Glukose-Cotransporters (SGLT1) und Glukosetransporter 2 (GLUT2) benötigt und gewährleistet auf diese Weise eine vereinfachte Glukoseabsorption [320, 321, 329]. Zudem scheint das Heterodimer an der, durch Glukose stimulierten, Freisetzung der Sättigungspeptide GLP-1 (*engl.* Glucagon-like peptide-1) und PYY (Peptid YY) beteiligt zu sein [324-327]. Studien an Mäusen lieferten darüber hinaus Hinweise auf eine Assoziation der TAS1R3-Untereinheit mit der Sekretion des Appetit-induzierten Hormons Ghrelin [322].

Im Gegensatz zum Süßrezeptor-Äquivalent ist für den Umamirezeptor hinsichtlich dessen extraoraler Expression und Funktion vergleichsweise wenig bekannt, obwohl dessen Transkripte in einigen Organen bereits beschrieben wurden [224]. So scheint der Umamirezeptor ähnlich dem TAS1R2/TAS1R3 im Gastrointestinaltrakt wichtige Aufgaben bei der Verdauung und dem Stoffwechsel zu besitzen, indem er durch Aktivierung von Glutamat oder L-Cystein zur Stimulation der Darm-Peristaltik beiträgt [330] und in enteroendokrinen Zellen als luminaler Sensor sowohl an der Freisetzung des Appetit-induzierten Hormons Ghrelin, als auch der Sekretion des Sättigungspeptids CCK (Cholecystokinin) beteiligt ist [331, 332].

Die extraorale Expression der Familie 1 Geschmacksrezeptoren beschränkt sich dabei jedoch nicht ausschließlich auf den Gastrointestinaltrakt [224]. So scheint der neuronal exprimierte Süßrezeptor in seiner Funktion als Glukosesensor im Hypothalamus zur Energie-Homöostase des Gehirns beizutragen [333-335] und könnte zudem mit für die Detektion von Liganden in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) und der Kommunikation zwischen CSF und dem Blut verantwortlich sein [316, 336]. In der Blase scheint die Aktivierung des Heterodimers durch künstliche Süßstoffe zu einer verstärkten Blasenkontraktion führen [337]. Hinsichtlich des Umami-Rezeptors TAS1R1/TAS1R3 wird angenommen, dass er über den GI-Trakt hinaus an einer Vielzahl an Zellen zur Detektion von Nährstoffen und Aminosäuren beteiligt ist und auf diesem Wege die Verfügbarkeit von Aminosäuren intra- und interzellulär kommuniziert [212, 338, 339]. So könnte das Heterodimer zusammen mit Bitterrezeptoren im Herzgewebe als Nährstoffsensoren fungieren [340] und in Spermien durch Regulation der basalen Calcium- und cAMP-Konzentrationen einen wichtigen Beitrag beim Befruchtungsprozess leisten [341]. Bezugnehmend auf das Immunsystem konnten *Malki et al.* [222] Gentranskripte für alle drei TAS1-Rezeptoren in 5 verschiedenen Zelltypen (Monozyten, natürliche Killerzellen, PMNs, B-

und T-Zellen) von Bluteukozyten identifizieren und zudem mittels siRNA eine Saccharin-induzierte, konzentrationsabhängige, Süßrezeptor-vermittelte Chemotaxis von PMNs beobachten. Zusätzlich zeigten sie durch Einsatz des Süßrezeptorinhibitors Lactisol eine TAS1R2-unabhängige, TAS1R3-abhängige neutrophile Migration, die auf eine alleinige Funktion eines TAS1R3-Homodimers hinweisen könnte [222]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine erst kürzlich publizierte Studie von *Skurk et al.* [228], die in humanen Neutrophilen eine Hochregulation der Transkripte von TAS1R2 und TAS1R3 in Folge der Stimulation mit dem künstlichen Süßstoff Saccharin belegen. Analog zur Studie von *Malki et al.* [222] zeigt sie eine Reaktion und Regulation chemosensorischer Rezeptoren auf Blutzellen in Antwort auf Bestandteile der Nahrung auf. Eine erhöhte chemotaktische Migration in Zusammenhang mit einer Reduktion von LPS-induzierten proinflammatorischen Zytokinen konnte zusätzlich in murinen Neutrophilen durch die Aminosäuren L-Alanin und L-Serin beobachtet werden. Sie ist vermutlich auf die Aktivierung des Umami-Rezeptors TAS1R1/TAS1R3 zurückzuführen, sodass diesem Heterodimer im Immunsystem eine funktionale Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und Infektionen zugeschrieben werden könnte [342].

Untersuchungen sowohl bei Menschen als auch Mäusen lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von TAS1R3 bzw. TAS1R2/TAS1R3 an der Immunantwort auf mikrobielle Komponenten bzw. Metaboliten. So konnten *Taya et al.* [343] in murinen Makrophagen eine durch das Disaccharid Trehalose vermittelte Reduktion der LPS-induzierten Expression inflammatorischer Zytokine (IL-1 β und TNF- α) in Folge einer Besiedlung des Parodontitis auslösenden Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* beobachten, welche möglicherweise mit dem Homomer TAS1R3 assoziiert ist. Studien mit TAS1R3-defizienten Mäusen deuten zudem auf eine Beteiligung des Rezeptors an der Regulation der Homöostase von chemosensorischen Büschelzellen des Dünndarms und weiterhin der Darmimmunität in Bezug auf mikrobielle Stimuli hin [328]. Im humanen Immunsystem der oberen Atemwege wiesen *Lee et al.* [344, 345] dem Süßrezeptor eine gegenüber den TAS2Rs antagonistische Funktion zu, indem er die durch Bitterrezeptoren vermittelte antimikrobielle Aktivität inhibiert. Dabei wird davon ausgegangen, dass TAS1R2/TAS1R3, wie in anderen Bereichen des Körpers, als Glukosesensor dient, jener Zucker, der von Mikroorganismen zur Deckung ihres Energiebedarfs benötigt wird. Eine reduzierte Glukosekonzentration deutet daher auf eine Infektion der Atemwege hin, woraufhin die Süßrezeptor-vermittelte Blockade von TAS2Rs aufgehoben und eine Bittergeschmacks-induzierte Immunität aktiviert werden könnte. Schließlich nehmen *Qin et al.* [346] an, dass TAS1R3-exprimierende Typ II-(Rezeptor)-Zellen auf der Zunge an der geschmackszellvermittelten Immunüberwachung beteiligt sind, da diese Zellen M- (*engl.* Microfold) Zell-ähnliche Eigenschaften aus schleimhautassoziiertem lymphatischem Gewebe besitzen und auf diese Weise auf mikrobielle Besiedlungen reagieren könnten.

Neben den Geschmacksrezeptorproteinen konnten zahlreiche Studien die Anwesenheit der kanonischen Signaltransduktionsmoleküle $G_{\alpha\text{Gustducin}}$ (GNAT3), PLC β 2 und TRPM5 in einer Vielzahl an Organen und Zellen, unter anderen den Büschelzellen [347, 348], dem Magendarmtrakt [349, 350], der Luftröhre [350, 351], der Lunge [350], dem Gehirn [350] und den PMNs [222] nachweisen. Sie unterstreichen die Anwesenheit chemorezeptiver Systeme in nahezu dem gesamten menschlichen Körper und verdeutlichen, dass deren Funktion nicht alleine auf der Geschmacksempfindung beruht, sondern abhängig vom jeweiligen Zelltyp oder Organ eine unterschiedliche Relevanz bzw. Eigenschaft besitzt [352]. Dieser Sachverhalt zeigt sich zusätzlich in der Assoziation von Geschmacksrezeptoren mit pathologischen Veränderungen und Erkrankungen. So wird eine Dysregulation der Süßrezeptorexpression bzw. dessen Signalproteinen mit Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes Typ II [353, 354] bzw. Adipositas [350, 354, 355] in Verbindung gebracht. Zudem scheint der Rezeptor, insbesondere TAS1R3, im Hippocampus wichtig für die Neurotransmission und neuronale Architektur zu sein, dessen Verlust mit Gedächtnisstörungen sowie veränderten Lern- und Sozialisierungsverhalten in Zusammenhang stehen könnte [356]. Genexpressionsstudien von Rezeptoren der TAS1-Familie in verschiedenen Tumoren weisen darüber hinaus auf eine potentielle Beteiligung dieser Proteine an Krebserkrankungen hin [357]. Nicht zuletzt gibt eine aktuelle Studie über das SARS-CoV-2-Virus Hinweise auf eine mögliche Herunterregulation der Süßrezeptorgene TAS1R2 und TAS1R3 in Epithelzellen des Nasen-Rachenraums von COVID-19 Patient*innen, die mit der Delta-Variante infiziert sind [358]. Es bedarf jedoch sowohl in Bezug auf pathologische Veränderungen als auch hinsichtlich deren natürlich vorkommender extraoraler Expression im Körper weitreichendere Studien und Untersuchungen, um die Funktionalität von Geschmacksrezeptoren, auch unter dem Gesichtspunkt der Medikamentenentwicklung, im Gesamtkontext aufklären und verstehen zu können.

EXPRESSION VON MGLURS IM NICHT-NEURONALEM GEWEBE Ähnlich den Geruchs- und Geschmacksrezeptoren bilden die metabotropen Glutamatrezeptoren eine Rezeptorfamilie, deren Expression und funktionales Spektrum weit über den Ort ihrer eigentlichen Lokalisierung, dem zentralen Nervensystem, hinausgeht, häufig jedoch mit unbekanntem Funktionen. So berichten Studien über die Beteiligung von mGluRs an der Proliferation und Transformation von Melanozyten und Keratinozyten der Haut [359-361] und von Osteoblasten im Knochen [362-366] sowie dessen Knorpelmineralisierung [367]. Darüber hinaus wurden mGluRs im Hoden und Spermien [368, 369] bzw. den Eierstöcken und der Gebärmutter [130, 370, 371] identifiziert, was auf eine mögliche Beteiligung dieser Rezeptoren bei der Produktion von Steroid-Hormonen, dem Eisprung bzw. der Befruchtung hindeuten könnte [369] und von Befunden über die Interaktion von mGluRs mit Östrogenrezeptoren [372-374] sowie deren Beteili-

gung an der Embryonalentwicklung [375-377] gestützt wird. Im Pankreas scheinen die Proteindimere in Anwesenheit von Glukose mit der Freisetzung von Insulin assoziiert zu sein und die Sekretion von Glukagon zu modulieren [378-380]. In der Niere werden sie mit der Regulation der Elektrolyt- und Wasserhomöostase und Kontrolle der Renin-Ausschüttung [369] und im Herzen mit der Modulation kardialer Funktionen (Kontraktion, Rhythmus) [381, 382] in Zusammenhang gebracht. Untersuchungen im Gastrointestinaltrakt berichten von einer Assoziation der metabotropen Glutamatrezeptoren mit der Freisetzung des Peptids Pepsinogen, der Vorstufe des Verdauungsenzyms Pepsin [383], sowie der Regulation der Magensäure- und Gastrin-Sekretion [369]. Zudem sollen sie hier eine Rolle bei der Darmmotilität und dem Elektrolyttransport spielen [130, 384].

Mehrere Studien berichten darüber hinaus über eine möglicherweise regulatorische Funktion von Glutamat im Immunsystem, basierend auf Befunden über erhöhte Plasma-Konzentrationen bei Patienten mit fortgeschrittenem Krebs bzw. mit Immunschwäche (HIV) [385-388]. Diese Annahme wird von weiteren Erkenntnissen aus der onkologischen Forschung untermauert, die auf einer differentiellen Expression verschiedener metabotroper Glutamatrezeptoren in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumoren, wie beispielsweise Gliomen, Leukämie, Lungen- und Brustkarzinomen und deren Zelllinien beruhen [389-391]. Zudem häufen sich Studien, welche eine Dysregulation von mGluRs bzw. dessen Agonisten Glutamat mit neurodegenerativen und Autoimmunerkrankungen wie Alzheimer [392-394], Parkinson [395-397], Schizophrenie [398, 399], Epilepsie [400, 401], der Huntington-Krankheit [402, 403], Amyotropher Lateralsklerose [404] und Multipler Sklerose [405-407] in Verbindung bringen.

Die überwiegende Mehrheit an Studien über die Expression und Wirkung von mGluRs im Immunsystem konzentriert sich auf T-Zellen [408], die bereits 1997 von *Kostanyan et al.* [409] als Zelltyp mit hoher Affinität für L-Glutamat beschrieben wurden. So konnten Rezeptoren aller drei mGluR-Familien in murinen und humanen Thymozyten, den Vorläuferzellen der T-Zellen, und T-Lymphozyten nachgewiesen werden, wo sie mit einer Vielzahl regulatorischer Funktionen in Abhängigkeit von Glutamat assoziiert sind [229-232, 410-412]. Je nach Konzentration beeinflusst die Aminosäure die T-Zellen dabei auf direkte Weise, indem sie deren Funktion sowohl aktivieren als auch unterdrücken kann [408]. So scheint L-Glutamat in physiologischen Konzentrationen von 1×10^{-8} – 1×10^{-4} M über mGluR1 T-Zellen vor dem apoptotischen AICD (*engl.* activation induced cell death), der für die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und Begrenzung laufender Immunreaktionen relevant ist [413], zu schützen [232]. Dieser Vorgang könnte bei der Bekämpfung chronischer infektiöser Organismen bzw. Erkrankungen notwendig sein, indem er die T-Zell-Proliferation nach der Antigenbindung fördert und die Zellen zwingt, sich mit der stetig wachsenden Menge an Antigenen auseinanderzusetzen, die über längere Zeiträume im Körper vorhanden sind [408]. Zudem scheinen

mGluRs in diesen Zellen am Ca^{2+} -Signalling sowie der Modulation von Genexpressionen und der adaptiven Immunität beteiligt zu sein [231, 414].

Eine erhöhte Konzentration von L-Glutamat im hohen mikromolaren bis millimolaren Bereich, wie sie im Blut bzw. zentralen Nervensystem bei einer Vielzahl pathologischer Veränderungen und Erkrankungen vorkommen [408], ist assoziiert mit einer inhibierten T-Zell-Proliferation und einer daraus resultierender Immundefizienz [233, 387]. *Pacheco et al.* [229] konnten zeigen, dass die metabotropen Glutamatrezeptoren 1 und 5 hierbei einen wesentlichen Beitrag leisten. Während mGluR5 auf T-Zellen scheinbar konstitutiv exprimiert wird und über Glutamat die Zellproliferation inhibiert, scheint die Expression von mGluR1 erst nach T-Zellaktivierung und der Bildung eines T-Zell-CD3-Komplexes induziert zu werden, woraufhin es zu einer Induktion der T-Zellproliferation kommt. Diese Art der Wechselwirkungen könnte die Ausbreitung aktivierter Zellen kontrollieren und zur Bekämpfung von Krankheiten beitragen [408] und zeigt weiterhin die Komplexität des Zusammenspiels mehrerer mGluRs mit unterschiedlichen Funktionen bei der Regulation höchstsensibler und sensitiver Prozesse des Immunsystems. Dabei scheint sich die Expression metabotroper Glutamatrezeptoren jedoch nicht allein auf diesen Zelltyp des Immunsystems zu beschränken. Studien wiesen die Anwesenheit der Dimere in natürlichen Killerzellen [415], B-Zellen [416, 417] und Neutrophilen [418] nach. Für zuletzt genannte konnten *Gupta et al.* eine Glutamat-induzierte Migration hin zu Entzündungen beobachten, welche über Klasse I mGluRs vermittelt und mit Wundheilung assoziiert wird [418, 419]. Dieser Befund unterstreicht die Ergebnisse einer Studie von *Collard et al.* [420], die die Expression von mGluR1, 4 und 5 in humanen Endothelzellen nachwies, deren Funktion in der Regulation der vaskulären Schutzfunktion über aktivierte PMNs und deren ausgeschüttetem Glutamat während einer Infektion liegt. Es bedarf jedoch weiterer Studien, um den komplexen Funktionsumfang metabotroper Glutamatrezeptoren sowohl auf den verschiedenen Zellen des Immunsystems als auch in Bezug auf neurologische Erkrankungen vollständig aufzuklären und die Entwicklung potentieller Arzneimittel voranzutreiben.

1.3 Heterodimerisierung von Klasse C GPCRs

Eine wesentliche und spezifische Eigenschaft, die Klasse C Rezeptoren von anderen GPCRs unterscheidet, ist deren Ausbildung von Dimeren, welche maßgebend für ihre Funktionalität und das Signalling sind. Erste Nachweise einer Rezeptordimerisierung gelangen 1996 für die Familie der metabotropen Glutamatrezeptoren, zunächst für mGluR5 und mGluR1, unter Beobachtung einer Disulfidbrücke zwischen konservierten Cysteinen der extrazellulären Ligandenbindedomänen (LBD) beider Rezeptoruntereinheiten [122, 421]. Nur zwei Jahre später konnte dieses Phänomen in denaturierenden Gelen ebenfalls für den CaS-Rezeptor beschrieben werden [422]. Die Verwendung biochemischer und spektroskopischer Methoden bestätigte schließlich die grundsätzliche, für eine funktionale Glutamat-vermittelte G-Proteinaktivierung essentielle Dimerisierung metabotroper Glutamatrezeptoren [123, 423, 424].

Anders als der CaSR und mGluRs benötigen die GABA_B- und TAS₁-Rezeptoren eine für ihre Funktionalität erforderliche Co-Expression zweier unterschiedlicher Rezeptor-Subtypen. So konnte der GABA_B-Rezeptor als erstes GPCR-Heterodimer in transfizierten Zellen identifiziert werden, das zwei strukturell verwandte Untereinheiten (GABA_{B1} und GABA_{B2}) für die Bildung eines funktionellen Rezeptors benötigt [425-427]. Dabei liefert GABA_{B1} die Agonisten-Bindungsstelle während über GABA_{B2} die G-Proteinkopplung und Rezeptoraktivierung erfolgt [428, 429]. Hinsichtlich der Geschmacksrezeptoren führt die Heterodimerisierung von TAS_{1R3} mit den jeweiligen TAS_{1R}-Untereinheiten zur Ausbildung des für den Geschmacksinn unerlässlichen Umami- (TAS_{1R1}/TAS_{1R3}) bzw. Süßrezeptors (TAS_{1R2}/TAS_{1R3}) [158-164].

Entgegen früherer Berichte, die die Anwesenheit von heterodimeren metabotropen Glutamatrezeptoren grundsätzlich ausschlossen [122], konnten kürzlich erschienene Studien deren Befähigung zur Bildung von Heterodimeren bestätigen und zudem für einige Rezeptoren spezifische pharmakologische und funktionelle Eigenschaften aufzeigen [123, 430-437]. So scheint innerhalb der Gruppe II die Heterodimerisierung von mGluR2/mGluR3 definierte und individuelle Konformationsdynamiken beider Ligandenbindedomänen aufzuweisen, die zu unterschiedlichen Basalaktivitäten führen [123]. Zudem wurde mGluR2 im Hippocampus als Heterodimer mit mGluR7, dem Rezeptor mit der geringsten Affinität für Glutamat [438] identifiziert, wo er dessen hohe EC₅₀-Werte in einen physiologischen Bereich bringt und in einer effizienteren Aktivierung bei niedrigeren Agonistenkonzentrationen als das homomere mGluR2 resultiert [435]. Das Verhalten von Heterodimeren gegenüber subtypspezifischen Agonisten scheint dabei abhängig von den jeweiligen Rezeptoruntereinheiten und der Art des Agonisten zu sein [439]. So erfolgt beispielsweise im Heterodimer mGluR2/mGluR4 die G-

Protein-Kopplung über mGluR4, was zu einer spezifischen und veränderten Sensitivität gegenüber allosterischen Modulatoren beider Rezeptoruntereinheiten führt [431, 434, 440, 441]. Zudem können mGluR1/mGluR5 Heterodimere ein funktionales Signalling betreiben, auch wenn nur eine Untereinheit in der Lage ist, den entsprechenden Agonisten zu binden [432, 442]. Gleichzeitig scheinen spezifische negative allosterische Modulatoren der jeweiligen mGluR1- bzw. mGluR5-Untereinheit zu einer starken Inhibition des Heterodimers zu führen, was dafür spricht, dass beide Untereinheiten für eine vollständige Rezeptoraktivität benötigt werden [432, 442].

Mit Hilfe einer zeitlich aufgelösten FRET-Methode konnten *Doumazane et al.* [430] zum ersten Mal 11 aus 21 möglichen mGluR-Kombinationen mit der Möglichkeit zur Bildung von Heterodimeren identifizieren, wobei der retinale mGluR6 aus der Studie ausgeschlossen wurde. Dieses Ergebnis wurde kürzlich von *Kukaj et al.* [437] bestätigt. Dabei scheint die Befähigung der Heterodimerisierung zwischen verschiedenen mGluR-Untereinheiten abhängig von der jeweiligen Gruppe der Rezeptoren zu sein. So konnten Heterodimere innerhalb aller drei Gruppen sowie zwischen den Gruppen I+II bzw. II+III, jedoch nicht zwischen I+III [437, 443], identifiziert werden. Zudem gibt es Hinweise auf eine mögliche Präferenz einiger mGluRs zur Heterodimerisierung im Vergleich zu ihrer Homodimerisierung. In LBD-Complementation Assays zeigte mGluR1 eine bevorzugte Heterodimerisierung mit mGluR5 gegenüber seiner Homodimerisierung, während dieses Phänomen für mGluR5 mit mGluR1 nicht nachgewiesen werden konnte [443]. Ähnliches scheint für mGluR2 zuzutreffen, der eine Heterodimerisierung mit mGluR3 anstelle einer Homodimerisierung bzw. Heterodimerisierung mit mGluR4 vorzieht bzw. die Dimerisierung mit mGluR7 eher abzulehnen scheint [443]. Ebenso scheinen mGluR4 und mGluR7 die Heterodimerisierung mit mGluR3 ihrer eigenen Homodimerisierung voranzustellen [443].

GPCRs umfassen Familien mit zahlreichen Rezeptor-Subtypen, die sensitiv gegenüber dem gleichen Agonisten sind [444]. So bedarf es einer hohen Spezialisierung der einzelnen Rezeptoren, um gemeinsam bzw. individuell auf unterschiedliche Agonistenkonzentrationen oder Lokalisationen unter anderem mittels verschiedener Signalling-Pathways, Effektorproteine oder Regulationspartnern spezifisch, schnell und präzise einwirken zu können. Sowohl die Homo- als auch die Heterodimerisierung von Klasse C GPCRs, insbesondere von mGluRs, weist die enorme molekulare Diversität dieser Rezeptoren auf, deren Ausmaß und physiologische Relevanz, insbesondere *in vivo*, bei weitem noch nicht vollständig verstanden sind. So sind weder die bevorzugten Neigungen bzw. Tendenzen der jeweiligen Untereinheiten zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren aufgeklärt, noch kennt man bereits deren, möglicherweise spezifischen, Liganden und deren in diesem Zusammenhang individuellen Signalling-Eigenschaften bzw. pharmakologische Antworten [439, 445]. Hinweise über eine mögliche Oligomerisierung von GABA_B-Rezeptoren in Form einer Dimerisierung von Heterodimeren in

Tetramere oder größere Komplexe [446-449] unterstreichen die enorme Vielfalt, Anpassungsfähigkeit und Komplexität der Klasse C GPCRs. Schließlich deuten Studien über eine mögliche Heterodimerisierung von Gruppe I mGluRs mit CaSR in Neuronen [450] sowie gleichartige Twists der VFT-Domänen von TAS1R3 und mGluRs in Folge von Rezeptoraktivierungen [451] auf ein weiteres, bisher unterschätztes Potential dieser GPCRs hin. Deren Befähigung und Präferenzen zur Heterodimerisierung beschränken sich möglicherweise nicht ausschließlich auf die jeweilige Rezeptorfamilie. Vielmehr müssen heterodimere Rezeptorkonstrukte zusätzlich zwischen den einzelnen Familien der Klasse C in Betracht gezogen und analysiert werden, um letztlich deren Komplexität, Funktionalität und physiologische Relevanz im gesamten menschlichen Körper vollständig verstehen und im Hinblick auf assoziierte Erkrankungen spezifische und wirksame Medikamente entwickeln zu können.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Fähigkeit von GPCRs zur Bildung von Heterodimeren über Klasse-C-GPCR-Familien hinweg ist eine Rezeptoreigenschaft, die bisweilen noch nahezu unerforscht ist. Neben Berichten über eine mögliche Heterodimerisierung von Gruppe I mGluRs mit CaSR in Neuronen [450] scheint es bisher keine dokumentierte Studien über diese Rezeptorkonstrukte zu geben, obgleich molekulare Modellierungsstudien kürzlich Ähnlichkeiten der Twists der VFT-Domänen von mGluRs und TAS1R3 nach deren Aktivierung beschrieben [451].

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3, deren Dimerisierungspotential bereits in arbeitsgruppeninternen Vorarbeiten identifiziert wurde, auf ihre Möglichkeit zur Heterodimerisierung auf Blutleukozyten zu untersuchen und hinsichtlich ihrer Funktionalität, möglicher spezifischer Agonisten und letztlich deren physiologischer Funktion hin zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt sollten dazu auf RNA- und Protein-Ebene mit Hilfe von Genexpressions- und Western Blot Analysen die beiden Rezeptoren bzw. ihre Gentranskripte in PMNs und T-Zellen nachgewiesen und im Anschluss anhand molekular- und zellbiologischer Methoden wie der Immunzytochemie, einem BRET-Assay sowie der Co-Immunpräzipitation deren mögliche physische Protein-Protein-Interaktion analysiert werden. Ein weiterer Zielbaustein der vorliegenden Arbeit stellte die Entwicklung eines auf Klasse C GPCRs ausgelegten heterologen Zellsystems zur Messung von Rezeptor-Agonist-Interaktionen dar, mit Hilfe dessen Konzentrations-Wirkungsbeziehungen des potentiellen Heterodimers mGluR2/TAS1R3 bzw. der jeweiligen Homodimere dargelegt und mögliche heterodimer-spezifische Agonisten oder Rezeptoreffekte identifiziert werden können. Parallel zu den funktionellen Nachweisen in transfizierten HEK-293 Zellen sollten anhand von ELISAs zudem mögliche heterodimer-spezifische Effekte in frisch isolierten Blutleukozyten analysiert werden, um möglicherweise eine physiologische Relevanz des Heterodimers im Immunsystem definieren zu können.

Mit dem Ziel, letztlich einen heterodimer-spezifischen Agonisten zu identifizieren, galt es, basierend auf der gemeinsamen Fähigkeit von mGluR2 und TAS1R3 im Umami-Rezeptor zur Bindung der Aminosäure Glutamat, ein Aminosäurescreening in D- und L-Form durchzuführen und im Falle eines positiven Hits die Interaktion in Blutleukozyten näher zu untersuchen. Des Weiteren war die Frage zu klären, ob neben Aminosäuren Metabolite aus bakteriellen Überständen über chemosensorische GPCRs wie mGluR2 und TAS1R3 auf Blutleukozyten als Agonisten wirken könnten.

Neben der Analyse einer Heterodimerisierung von Klasse C GPCRs und deren möglichen Interaktion mit bakteriellen Metaboliten bildete die Charakterisierung und Aufklärung der physiologischen Funktion des Geruchsrezeptors OR11A1, der arbeitsgruppenintern bereits als Target für das aus Bodenbakterien stammende bityklische Terpen Geosmin identifiziert werden konnte, einen weiteren Zielbaustein. Anhand eines Screenings von Rezeptororthologen sollte zunächst die Funktionalität und physiologische Relevanz von OR11A1 in sechs verschiedenen Spezies untersucht werden, um die evolutionäre Konservierung des Rezeptors zu analysieren. Darüber hinaus bestand das Ziel in der möglichen Identifizierung von hochsensitiven OR11A1-Varianten aus diesen Spezies, die mit ihrer Physiologie auf die Detektion von Geosmin ausgerichtet zu sein scheinen, bspw. in Form von Wasser- und Nahrungsmitteldetektion bzw. Navigation. Ein möglicher hochsensitiver OR11A1-Rezeptor könnte folglich als Geosminsensoren Anwendung bei Qualitätskontrollen von Lebensmitteln oder als Instrument zur Überwachung von Wasserqualitäten erlangen. Anhand von Extrakten aus geosmin-produzierenden Stämmen von *Streptomyces albus* und *Streptomyces albidoflavus* sollte daher letztlich der Nachweis eines hochsensitiven OR11A1-Rezeptors erbracht werden, der die Fähigkeit besitzt, Geosmin aus einem komplexen Gemisch bakterieller Substanzen bzw. Metabolite heraus zu detektieren und somit eine Bestätigung für Geosmin als neuen Agonisten für den OR11A1 Rezeptor sowie eine weitere, bisher unbekannte Interaktion zwischen einem bakteriellen Metaboliten und einem chemosensorischen GPCR liefern würde.

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Aminosäuren

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Aminosäuren sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2.1: Auflistung verwendeter Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
3-Oxo-C12-HSL	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Acetonitril	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Agarose	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ameisensäure	Merck Millipore, Massachusetts, USA
Ammoniumsulfat	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Ampicillin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BenchTop 100 bp DNA Größenstandard	Promega Corporation, Madison, USA
BenchTop 1 kb DNA Größenstandard	Promega Corporation, Madison, USA
BSA (Fraktion V, proteasefrei)	Rockland Immunochemicals, Inc., Pottstown, USA
C4-HSL	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Calciumchlorid Dihydrat	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>cis</i> -2-Dezensäure	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Cobalt(II)-chlorid Hexahydrat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Cyclo (Δ -Ala-L-Val)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
D-(+)-Glucose	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
D-Luziferin-EF, Mononatriumsalz	Promega Corporation, Madison, USA
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNA Loading Dye, 5x	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.1: Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
dNTPs (PCR Nucleotid Mastermix, 10 mM)	Promega Corporation, Madison, USA
Dulbecco's MEM (4,5 g/L D-Glucose)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eisen(II)-chlorid	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Ethanol, absolut	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
FBS Superior	Bio&Sell GmbH, Feucht, Deutschland
fMLF	Tokio Chemical Industry, Tokio, Japan
Forskolin	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
GelRed™	Biotium Inc., Hayward, USA
Gibco RPMI 1640 mit L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
HAT-Mediumzusatz, 50x	Gibco by Life Technologies, Paisly, USA
HHQ	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kupfersulfat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Laemmli-Puffer (2x)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Lactisol	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
LB-Agar Pulver nach Miller	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium Pulver nach Miller	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
LY379268	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.1: Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
Maculosin	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
MACSQuant® Calibration Beads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant® Running Buffer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant® Storage Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant® Washing Solution	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
mGluR2 Antagonist 1	Biozol GmbH, Eching, Deutschland
Mononatriumglutamat	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriummolybdat Dihydrat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Natriumselenat	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
Nuklease-freies Wasser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
PBS	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (10000 U/mL)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pertussis-Toxin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
PQS	Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA
Proteinmarker IV (pre-stained)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pyocyanin	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.1: Fortsetzung

Chemikalie	Hersteller
RIPA-Puffer	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
TAE-Puffer, 50x	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
TBS-Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Tris-Glycin-SDS Elektrophorese Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Trypsin/EDTA-Lösung in PBS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypton/Penton	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween®20	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
ViaFect™ Transfektionsreagenz	Promega Corporation, Madison, USA
Zinkchlorid	Alfa Aesar, Massachusetts, USA

Tabelle 2.2: Auflistung verwendeter Aminosäuren

Aminosäure	Hersteller
D-Alanin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Alanin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Arginin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Arginin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Asparagin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Asparagin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Asparaginsäure	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Cystein	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Cystein	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Glutamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Glutamin für Zellmedium (200 mM)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Histidin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Histidin	Alfa Aesar, Massachusetts, USA
D-Isoleucin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Isoleucin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Leucin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Leucin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Lysin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Methionin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Methionin	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
D-Phenylalanin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Phenylalanin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Prolin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.2: Fortsetzung

Aminosäure	Hersteller
L-Prolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-Serin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Serin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Threonin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Threonin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Tryptophan	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
L-Tryptophan	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland
D-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
D-Valin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Valin	TCI GmbH, Eschborn, Deutschland

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, falls nicht anders angegeben autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert. Für Puffer und Medien erfolgte die gleiche Herstellungsweise mit individueller Autoklavierung und Lagerung.

Tabelle 2.3: Auflistung verwendeter Lösungen, Medien und Puffer

Lösungen	Zusammensetzung	
1 M CaCl ₂	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	147,02 g
2 M Glukose	Glukose (sterilfiltriert)	360,32 g
1 M HEPES	HEPES	238,31 g
10 mM HEPES	HEPES	2,38 g
1 M KCl	KCl	74,55 g
2 M Mg ²⁺	MgCl ₂ x 6 H ₂ O MgSO ₄ x 7 H ₂ O (sterilfiltriert)	203,2 g 246,47 g
1 M NaCl	NaCl	58,44 g
1 M NaOH	NaOH	40,0 g
Ampicillin (Lagerung bei -20 °C zu je 1 ml)	10 g Ampicillin in 100 ml Reinstwasser Sterilfiltration (0,2 µm Membranfilter)	
Kanamycin (Lagerung bei -20 °C zu je 1 ml)	5 g Kanamycin in 100 ml Reinstwasser Sterilfiltration (0,2 µm Membranfilter)	
D-Luziferin (Lagerung bei -80 °C zu je 115 µl)	250 mg D-Luziferin in 8150 µl 10 mM HEPES	
Puffer		
Puffer für Lumineszenzmessungen (für jede Messung frisch anzusetzen)	1 M NaCl-Lösung	140 ml
	1 M HEPES-Lösung	20 ml
	1 M KCl-Lösung	5 ml
	1 M CaCl ₂ -Lösung	1 ml
	Glucose (10 mmol/L) pH 7,5	1,8 g
TAE-Puffer für Gelelektrophorese	50x TAE-Puffer	20 ml
Tris-Glycin-SDS-Laufpuffer für Western Blot	10x Tris-Glycin-SDS Puffer	100 ml
TBST-Puffer für Western Blot	10x TBS	100 ml
	Tween® 20	1 ml
Blocklösung für Western Blot (100 ml)	TBST	100 ml
	BSA	5 g

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.3: Fortsetzung

Medien	Zusammensetzung	
Kulturmedium HEK-293 Zellen (Lagerung bei 4 °C)	Dulbecco's MEM (4,5 g/L Glucose)	450 ml
	FBS Superior (sterilfiltriert)	50 ml
	L-Glutamin	5 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
Kulturmedium NxG 108CC15-Zellen (Lagerung bei 4 °C)	Dulbecco's MEM (4,5 g/L Glucose)	450 ml
	FBS Superior (sterilfiltriert)	50 ml
	HAT-Mediumzusatz	10 ml
	L-Glutamin	5 ml
	Penicillin/Streptomycin	5 ml
LB-Agar für Nährbodenplatten (Lagerung bei 4 °C)	LB-Agarpulver pH 7,5	40 g
	Autoklavieren und anschließende Zugabe von 1 ml Kanamycin- bzw. Ampicillin- Lösung	
LB-Medium für Bakterienkulturen (Lagerung bei 4 °C)	LB-Mediumpulver pH 7,5	25 g
	Autoklavieren und anschließende Zugabe von 1 ml Kanamycin- bzw. Ampicillin- Lösung	
SOB-Medium (Lagerung bei -20 °C)	Trypton/Penton	20 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	0,6 g
	KCl	0,2 g
Autoklavieren und anschließende Zugabe von 10 ml 2 M Mg ²⁺ -Lösung		
SOC-Medium (Lagerung zu je 1 ml bei -20 °C)	SOB-Medium	1 L
	Glukose	3,603 g

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.3: Fortsetzung

Medien	Zusammensetzung
MOD-Medium (nach [452, 453] (Lagerung bei 4 °C)	<i>Grundmedium</i>
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 6 g
	K ₂ HPO ₄ 1 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,4 g
	L-Glycin 0,39 g
	L-Valin 0,91 g
	L-Threonin 0,91 g
	L-Methionin 0,4 g
	L-Histidin 0,36 g
	L-Arginin 0,46 g
	L-Asparaginsäure 0,91 g
	L-Cystein 0,04 g
	L-Isoleucin 0,7 g
	L-Leucin 1,37 g
	L-Phenylalanin 0,28 g
	L-Lysin 1,18 g
	L-Serin 0,66 g
	L-Tyrosin 0,042 g
	pH 7,2; Auf 982 ml mit Reinstwasser auf- füllen
	Autoklavieren (10 min, 110 °C)
	<i>Spurenelemente (je 100 ml)</i>
	FeCl ₂ x 6 H ₂ O 0,0675 g
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O 0,005 g
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O 0,003 g
	CaCl ₂ 0,0275 g
	ZnCl ₂ 0,0085 g
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O 0,003 g
	CuSO ₄ 0,004 g
	NaSeO ₄ 0,0024 g
	Einzelansetzen
	FeCl ₂ x 6 H ₂ O sterilfiltrieren
	Restliche autoklavieren (17 min, 121 °C)
	Grundmedium, jeweils 1 ml Spurenele- mente (= 8 ml) und 10 ml 2 M Glukose- Lösung zusammengeben

2.1.3 Antikörper, Bakterienstamm, Enzyme, Kits und Liganden

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper, Enzyme, Kits und Liganden sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2.4: Auflistung verwendeter Antikörper, Enzyme, Kits und Liganden

Antikörper	Hersteller
Anti-TAS1R3 Kaninchen-Antikörper (#A100296)	antibodies.com, Cambridge, United Kingdom
Anti-mGluR2 Kaninchen-Antikörper (#A10561)	ABclonal Inc., Woburn, USA
Ziege anti-Kaninchen Sekundärantikörper (#G-21234)	Invitrogen, Waltham, USA
Bakterienstamm	
XL1-Blue Supercompetent Cells	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Enzyme	
T4 DNA Ligase (3 u/μL) mit Rapid Ligation Puffer (2x)	Promega Corporation, Madison, USA
ddPCR Supermix for Probes (No dUTP)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DNase I (RNase-frei) mit RDD Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>EcoRI</i> (12 u/μL) mit Puffer H	Promega Corporation, Madison, USA
Endoglycosidase H	Promega Corporation, Madison, USA
GoTaq Hot Start Green Master Mix, 2x	Promega Corporation, Madison, USA
<i>NotI</i> (10 u/μL) mit Puffer H	Promega Corporation, Madison, USA
Q5 [®] Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase mit Q5 [®] Reaction Puffer	NEB, Massachusetts, USA
SsoAdvanced Universal SYBR Green Super-mix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.4: Fortsetzung

Kits	Hersteller
10 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DG8 Cartridges und Gaskets QX200 für ddPCR	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Droplet Generation Oil for Probes	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DuoSet Ancillary Reagent Kit 2	R&D Systems, Minnesota, USA
Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA	R&D Systems, Minnesota, USA
MACSxpress® Erythrocyte Depletion Kit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSxpress® Whole Blood Neutrophil Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Pan T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pure Yield™ Plasmid Midiprep	Promega Corporation, Madison, USA
QIAquick MinElute™ Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm PVDF Transfer Packs	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Zentrifugaleinheit Microsep™ Advance 1kD	Pall Corporation, New York, USA
Liganden	
HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand	Promega Corporation, Madison, USA

2.1.4 Zelllinien

Die heterologe Expression von Geschmacksrezeptoren erfolgte in den folgenden Zelllinien.

Tabelle 2.5: Auflistung verwendeter Zelllinien

Zelllinie	
HEK-293 (Wildtyp)	ATCC® CRL-1573™ ATCC, Virginia, USA
NxG108CC15 (Wildtyp)	Christian Harteneck, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Tübingen, Deutschland

2.1.5 Oligonukleotide und Sonden

Die für die PCR, qPCR, ddPCR und Sequenzierung eingesetzten Oligonukleotide und Sonden wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, mittels HPLC aufgereinigt und in Reinstwasser (100 µmol/L) gelöst. Eine Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide und Sonden ist im Anhang (Tabelle A.1-A.3) zu finden.

2.1.6 Plasmide und Plasmid-DNA

Die nachfolgende Tabelle führt alle Plasmide und Plasmid-DNA auf, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Eine Auflistung der entsprechenden NCBI-Referenzsequenzen aller Rezeptoren sowie der Sequenzen für IL-6, HaloTag® und rho-tag sind im Anhang (Kapitel A.2-A.3) zu finden.

Tabelle 2.6: Auflistung verwendeter Plasmide und Plasmid-DNA

Plasmide und Plasmid-DNA	Hersteller/bereitgestellt von
pcDNA3.1(+)	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
pI2-dk (rho-tag(39))	Krautwurst <i>et al.</i> [454], Shirokova <i>et al.</i> [101]
pFN210A	Promega Corporation, Madison, USA
pFN210A (+IL-6 & HaloTag®)	Franziska Noe, Julia Bauer, LSB, Freising
pGloSensor™-22F cAMP	Promega Corporation, Madison, USA
<i>hs</i> RTP1S (in pI2-dk (rho-tag(39)))	Tim Frey, LSB, Freising
<i>hs</i> G _{ai1} (in pcDNA3.1(+))	GenScript Biotech Corp., New Jersey, USA
<i>hs</i> G _{ai2} (in pcDNA3.1(+))	General Biosystems Inc., Durham, USA
<i>hs</i> G _{ai3} (in pcDNA3.1(+))	General Biosystems Inc., Durham, USA
<i>hs</i> G _{oalf} (in pI2-dk (rho-tag(39)))	Tim Frey, LSB, Freising
<i>hs</i> GRM2 (in pFN210A (+IL-6 & HaloTag®))	Julia Bauer, LSB, Freising
<i>mm</i> Grm2 (in pFN210A (+IL-6 & HaloTag®))	General Biosystems Inc., Durham, USA
<i>hs</i> TAS1R1 (in pFN210A +IL-6 & HaloTag®)	Julia Bauer, LSB, Freising
<i>hs</i> TAS1R2 (in pFN210A +IL-6 & HaloTag®)	Julia Bauer, LSB, Freising
<i>hs</i> TAS1R3 (in pFN210A +IL-6 & HaloTag®)	Julia Bauer, LSB, Freising
<i>mm</i> TAS1R3 (in pFN210A +IL-6 & HaloTag®)	General Biosystems Inc., Durham, USA
<i>hs</i> OR11A1 (in pFN210A +IL-6 & HaloTag®)	Tim Frey, LSB, Freising

hs = homo sapiens, *mm* = mus musculus

2.1.7 Geräte

Für die vorliegende Arbeit wurden die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Geräte verwendet.

Tabelle 2.7: Auflistung verwendeter Geräte

Gerät	Hersteller
Bioanalyzer Instrument 2100	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA
ddPCR System QX200	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
DG8 Cartridge Holder für ddPCR	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Gelelektrophorese Perfect Blue Midigel-System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Gelelektrophorese Power Source 300 V	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Genoplex Geldokumentationssystem	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
GloMax [®] Discover Microplate Reader	Promega Corporation, Madison, USA
Heizblock Digital Block Heater HX-1	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
High Performance UV Transilluminator	UVP LLC, Upland, USA
HPLC SEDEX LT-ELSD 90	Sedere, Paris, Frankreich
HPLC Multilängendetektor-System MD-2010	Jasco Corporation, Tokio, Japan
HPLC Säule Xbridge BEH Amide, 130 Å, 10 mm x 250 mm, 5 µm	Waters GmbH, Eschborn, Deutschland
Inkubationsschrank INDU-Line	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Inkubationsschrank (CO ₂) HERACELL VIOS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MACSmix [™] Tube Rotator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSQuant Durchflusszytometer	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACSexpress [®] Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Tabelle 2.7: Fortsetzung

Gerät	Hersteller
Mikroplattenphotometer Infinite M200	Tecan Group AG, Männergdorf, Schweiz
Mikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikroskop Axio Vert A1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
NanoDrop™ One Spektrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter Slimtrode	Hamilton Messtechnik GmbH, Höchst, Deutschland
Reinstwasseranlage	ELGA LabWater, Lane End, Vereinigtes Königreich
Schüttelinkubator KS 4000 i control	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Thermocycler C1000 Touch	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Thermocycler Real-Time PCR CFX Touch	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
ThermomixerC	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Vakuum Eluator VacMan	Promega Corporation, Madison, USA
Vakuumkonzentrator Concentrator plus	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Western Blot ChemiDoc Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Western Blot Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Western Blot PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Western Blot Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Wasserbad WNB45	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5430	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5920 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Multifuge 3S+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Himac CT15RE	Hitachi Koki Co. Ltd., Tokio, Japan

2.1.8 Software und Datenbanken

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Auswertungen wurden die folgenden Softwares verwendet. Zudem sind die für Nukleotid- und Proteinsequenzanalysen herangezogenen Datenbanken mit ihren Quellen angegeben.

Tabelle 2.8: Auflistung verwendeter Software und Datenbanken

Software/Datenbank	Herausgeber/Quelle
CFX Maestro 1.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
ChemDraw 22.0.0	PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA
CLC Sequence Viewer 8	CLC bio, Aarhus, Dänemark
Finch TV	Geospiza Inc., Seattle, USA
Flowlogic	Inivai Technologies, Melbourne, Australien
HPLC Galaxie™ Software	Varian Inc., Walnut Creek, USA
Image Lab Software 6.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Instinct® Software	Promega Corporation, Madison, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MACSQuantify Software	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Origin 2023	OriginLab Corporation, Northampton, USA
QuantaSoft™ Analysis Pro 1.0	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
SigmaPlot 14.0	Systatsoftware, Palo Alto, USA
International Union of Basic and Clinical Pharmacology (IUPHAR) / British Pharmacological Society (BPS) Guide to Pharmacology	https://www.guidetopharmacology.org/about.jsp
NCBI (National center for biotechnology information)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html
UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser	https://www.ucsc.edu/

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von PMNs und T-Zellen aus humanen Buffy Coats

Die Isolation von PMNs und T-Zellen erfolgte aus frischen humanen Buffy Coat Proben, die von freiwilligen Spenderinnen und Spendern aus der Praxis von Herrn Dr. Gerd Becker des Sonnen-Gesundheitszentrums München stammten. Um die Funktionalität der Blutzellen für nachfolgende Funktionsstudien nicht zu beeinflussen und deren Aktivierung zu verhindern, wurde für die Zellaufreinigung jeweils ein „untouched“ Ansatz gewählt. Bei dieser Methode werden alle Blutzellen, in diesem Fall mit Ausnahme von PMNs bzw. T-Zellen, mit Biotin-konjugierten Antikörpern und magnetischen Beads markiert und im Anschluss über einen Magneten von den gewünschten Zellen separiert. Hierfür diente das MACSxpress® Whole Blood Neutrophil bzw. Pan T Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi, unter Einhaltung der jeweiligen Herstellerangaben. Die abschließende Deletion von Erythrozyten wurde mit Hilfe des MACSxpress® Erythrocyte Depletion Kits erreicht, dessen Funktionsprinzip auf der gleichen Separationsmethode, wie oben beschrieben, basiert. Für anschließende Stimulationsstudien wurden die Zellen für 10 min bei 300 x g zentrifugiert, das Pellet mit den entsprechenden Stimulantien (s. 2.4.1) in RPMI-Medium resuspendiert und im CO₂-Inkubator inkubiert. Die Lagerung der Zellen für Genexpressionsstudien erfolgte als Zellpellet bei -80 °C.

2.2.2 RNA-Isolation aus gewonnenen PMNs und T-Zellen

Für die Isolation von RNA wurde das jeweilige Blutzellpellet zunächst mit 600 µl RLT-Lysepuffer + 1 % Mercaptoethanol resuspendiert, um RNasen, die während der Zellyse freigesetzt werden, irreversibel zu denaturieren und dadurch eine hochqualitative RNA zu erzielen. Die anschließende Homogenisierung mittels einer 1 ml Spritze und Sterican® G21 Kanüle (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) führte zur Zerstörung der Zellen und ihrer Organellen und zur Freisetzung von RNA. Die anschließende RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen gemäß den Herstellerangaben. Um eine vollständige Entfernung genomischer DNA zu gewährleisten, wurden zusätzlich zwei 15-minütige *DNaseI*-Verdaue auf der Kit-Säule durchgeführt. Die RNA-Elution erfolgte in nukleasefreiem Wasser, die anschließende RNA-Konzentrationsbestimmung wurde mittels eines NanoDrop™ One Spektrometers durchgeführt. Die Lagerung der RNA fand bei -80 °C statt.

2.2.3 RNA-Qualitätsbestimmung

Zur Qualitätskontrolle wurden gemäß den MIQE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) [455] stichpunktartig RNAs aus stimulierten und unstimulierten PMNs und T-Zellen ausgewählt und mit Hilfe des Bioanalyzers

2100 der Firma Agilent Technologies analysiert. Das Prinzip des Gerätes beruht auf einer kapillaren Elektrophorese (Lab-on-Chip Technologie), unter Verwendung eines RNA-interkalierenden Farbstoffes, der mittels laserinduzierter Fluoreszenz detektiert werden kann. Aufgrund des konstanten Masse-zu-Ladungsverhältnisses werden die RNA-Moleküle der Größe nach aufgetrennt. Das entstandene Elektropherogramm zeigt zwei unterschiedliche ribosomale Peaks (18S und 28S), wobei eine hoch qualitative RNA einem 28S/18S-rRNA Verhältnis von 2 entspricht. Basierend auf dem jeweils ermittelten Verhältnisses generiert der Software-Algorithmus ein Nummerierungssystem von 1-10, den sogenannten RIN-Wert (*engl.* RNA Integrity Number), wobei 1 eine vollständig degradierte und 10 eine intakte, nicht fragmentierte RNA bedeutet [456].

Unter Verwendung des Nano- sowie Pico-Kits nach Herstellerangaben wurden RIN-Werte zwischen 5,9 und 8,0 gemessen (Abb. A.2).

2.2.4 cDNA-Synthese

Zur späteren Analyse der Genexpression wurde mittels Reverser Transkription (RT) die aus den Blutzellen isolierte RNA in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben. Unter Verwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits der Firma Thermo Fisher Scientific wurden auf Eis pro Ansatz je 2 µg RNA nach Herstellerangaben in cDNA übersetzt. Bei weniger RNA-Ausgangsmaterial fand eine Angleichung des Reaktionsvolumens mit nukleasefreiem Wasser statt. Um mögliche Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA durch einen unvollständige *DNaseI*-Verdau ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine –RT-Kontrolle durchgeführt, indem analog zur oben beschriebenen Durchführung vorgegangen und lediglich das Enzym *reverse Transkriptase* durch Wasser ersetzt wurde, sodass in diesen Kontrollproben keine Umschreibung von RNA in cDNA ermöglicht wurde. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient in der Molekularbiologie unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotide als Verfahren zum Nachweis und zur Amplifikation bestimmter Gene auf der DNA. Im Anschluss an die cDNA-Synthese lieferte sie an dieser Stelle durch Vervielfältigung des Housekeeping-Gens *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Aufschluss über eine gelungene Synthese sowie über mögliche Verunreinigungen der Proben mit genomischer DNA.

Für einen 25 µl PCR-Ansatz wurden 0,5 µl cDNA bzw. –RT-Kontrolle mit 0,25 µl Q5®-Polymerase, jeweils 0,5 µM ‚forward‘ und ‚reverse‘ Oligonukleotid (ab-270/ab-271, siehe Tab. A1), 200 µM dNTPs, 5 µl Q5® Reaction Buffer, 5 µl Q5® High GC Enhancer, 0,75 µl DMSO und 10,25 µl nukleasefreiem Wasser vermischt. Zusätzlich wurde eine Kontroll-PCR ohne cDNA

als NTC (no template control) durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler C1000 touch nach folgendem Protokoll:

Denaturierung	98 °C für 30 sec
10 Zyklen mit einem Temperaturabfall um 1 °C pro Zyklus für folgende Schritte	
Denaturierung	98 °C für 15 sec
Annealing	60 °C für 30 sec
Extension	72 °C für 2 min
Weitere 30 Zyklen mit folgenden Schritten	
Denaturierung	98 °C für 15 sec
Annealing	50 °C für 30 sec
Extension	72 °C für 2 min
Finale Elongation	72 °C für 2 min

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Überprüfung einer erfolgreich verlaufenden PCR und bietet darüber hinaus die Möglichkeit, im Gel aufgetrennte DNA-Fragmente zu isolieren, auszuscheiden und im Anschluss aufzureinigen. Unter Verwendung eines 0,7 %igen, mit Gel-Red™ gefärbten Agarose-Gels wurden die amplifizierten PCR-Produkte unter Laufbedingungen von 130 V für 30 min aufgetrennt. Als Referenz zur Ermittlung der Bandengrößen diente ein 100 bp DNA Größenstandard. Im Anschluss wurden die Gele mit Hilfe eines GenoPlex Systems mit integrierter CCD Kamera ausgewertet und fotografiert (Abb. A.3-4).

2.2.7 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) erlaubt durch Amplifizierung bestimmter Gene auf der cDNA mittels genspezifischer Oligonukleotide die Quantifizierung von Transkripten und wird daher zur Analyse der Genexpression herangezogen. Durch den Einsatz des DNA-interkalierenden Farbstoffes SYBR® Green kommt es während der Amplifikation zu einem Fluoreszenzsignal, das detektiert und für die Bestimmung des Ct-Wertes (Cycle threshold) herangezogen wird. Dieser Wert gibt die Anzahl der PCR-Zyklen bis zum Erreichen eines Schwellenwertes (threshold) an, an dessen Punkt die Fluoreszenz deutlich über die Hintergrundfluoreszenz steigt und als Beginn der exponentiellen Phase der Amplifizierung angesehen werden kann. Je höher die Genexpression ist, desto geringer ist der Ct-Wert. Zur Schmelzkurvenanalyse werden die Proben in einem letzten Schritt langsam erhitzt, sodass es bei einer bestimmten Temperatur zur Trennung der beiden DNA-Stränge kommt und der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird. Ist nur ein Genprodukt im Reaktionsansatz vorhanden, zeigt sich dies in einer

klaren Schmelzkurve mit einem einzelnen Peak, was auf spezifische Primer und ein Ausgangsprodukt ohne Verunreinigungen schließen lässt.

Die Analyse der Genexpression aller acht *GRM* und *TAS1R* Gene erfolgte in Duplikaten mittels genspezifischer Oligonukleotide (Tab. A.1), die im Anschluss gemäß der MIQE Guidelines [455] auf die Expression zweier stabil exprimierter, nicht regulierter Haushaltsgene (*GAPDH* und *ACTB* (Beta-Actin)) normalisiert wurden. Diese Stellten sich in einer früheren Studie als die geeignetsten für die Genexpressionsanalyse in PMNs und T-Zellen heraus [222].

Für einen 10 µl qPCR-Ansatz wurden 10 ng cDNA (aus PMNs bzw. T-Zellen) mit jeweils 0,5 µM ‚forward‘ und ‚reverse‘ Oligonukleotid und 5 µl SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (2x) vermischt und mit nukleasefreiem Wasser das Reaktionsvolumen angepasst. Zusätzlich wurde eine NTC erzeugt, die anstelle der cDNA nukleasefreies Wasser enthielt. Die Amplifikation erfolgte in einem CFX96 Touch Real-Time PCR Thermocycler mit den folgenden Parametern:

Denaturierung 95 °C für 1 min

45 Zyklen folgenden Schritten

Denaturierung 95 °C für 15 sec

Annealing 60 °C für 1 min

Schmelzkurvenanalyse: 65-95 °C in 0,5 °C Schritten (5 sec./Schritt)

Die Ct-Werte und Schmelzkurven wurden mit Hilfe der CFX Maestro-Software ermittelt, mit einem Cut-off Ct-Wert von ≥ 40 . Proben mit unregelmäßiger Schmelzkurve wurden in der Genexpressionsanalyse nicht berücksichtigt. Die Ermittlung der ΔCt - sowie $2^{-\Delta\Delta Ct}$ - Werten erfolgte anhand der nachfolgenden Formeln [457].

$$\Delta Ct = Ct_{Gen\ von\ Interesse} - Ct_{Haushaltsgen} \quad (1)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{stimulierte\ Probe} - \Delta Ct_{nicht\ stimulierte\ Probe} \quad (2)$$

2.2.8 Droplet Digital PCR (ddPCR)

Die droplet digital PCR ist eine hochpräzise, sensitive Methode zur absoluten Quantifizierung von Nukleinsäuren, die keine Standardkurve benötigt. Unter Verwendung einer Wasser-Öl-Emulsion werden cDNA Moleküle vor der Amplifikation zusammen mit ihren Reaktionskomponenten in tausende ‚Droplets‘ vereinzelt, wobei jedes eine einzelne Reaktionskammer darstellt. Genspezifische Fluoreszenzsonden ermöglichen die Detektion der gewünschten Gene

bzw. Isoformen und geben im Anschluss Auskunft über die Anzahl der ‚Droplets‘ mit amplifizierter Zielsequenz. Dabei ist der Anteil an positiven Reaktionsgefäßen proportional zur eingesetzten DNA-Menge, sodass unter Verwendung der Poisson-Verteilung die absolute Konzentration des Gens von Interesse in der Ausgangsprobe bestimmt werden kann [458].

Für die Identifizierung der am häufigsten in den Blutzellen vorkommenden *GRM2*-Isoform wurden isoformspezifische Oligonukleotide und Fluoreszenzsonden designt (Tab. A.2). Da Isoform 3 (NM_000839.5) kein spezifisches Sequenzmuster aufweist, wurden die Oligonukleotide und die Sonde für diese Isoform so konzipiert, dass sie an alle drei Isoformen binden. Für eine 20 µl ddPCR-Reaktion wurden in Duplikaten 100 ng cDNA (aus PMNs bzw. T-Zellen) mit 10 µl 2x ddPCR Supermix for Probes (No dUTP), jeweils 0,9 µM Oligonukleotiden, 0,25 µM Fluoreszenzsonde (FAM) und der entsprechenden Menge nukleasefreiem Wasser vermischt. Als Negativkontrolle (NTC) diente ein Ansatz ohne cDNA-Zugabe. Im Anschluss erfolgte die ‚Droplet‘-Generierung mit Hilfe einer DG8-Kartusche unter Zugabe von 70 µl ‚Droplet‘-Öl in einem ‚Droplet‘ Generator™. Die eigentliche Amplifikation wurde in einem Thermocycler C1000 touch mit den folgenden Parametern durchgeführt:

Enzymaktivierung	95 °C für 10 min
40 Zyklen mit folgenden Schritten	
Denaturierung	94 °C für 30 sec
Annealing	58 °C für 1 min
Enzymdeaktivierung	98 °C für 10 min

Die anschließende Detektion des Fluoreszenzsignals und die entsprechende Genexpressionsanalyse erfolgte in einem QX200 Droplet Reader unter Zuhilfenahme der QuantaSoft™ Analysis Pro Software 1.0. Dabei wurde jeweils der vom Gerät ermittelte Wert in Transkriptkopien/µl auf die Einheit Transkriptkopien pro 100 ng eingesetzter cDNA umgerechnet, anhand derer im Anschluss das prozentuale Vorkommen der jeweiligen Isoformen ermittelt wurde. Aufgrund des Fehlens eines spezifischen Sequenzmusters für Isoform 3 (s. oben) wurden die Isoformen 1 und 2 im Verhältnis zur dritten Isoform berechnet und ihr gemeinsamer Prozentsatz von Isoform 3 abgezogen.

2.2.9 Western Blot

Der Western Blot dient in der Molekularbiologie zum Nachweis von Proteinen innerhalb eines Proteingemischs, beispielsweise eines Zelllysats durch deren Übertragung auf eine Trägermembran und dem anschließenden immunologischen Nachweis mittels proteinspezifischer Antikörper. Für den Nachweis von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs und T-Zellen, sowie der Spezifitätsprüfung der verwendeten primären Antikörper in transfizierten NxG-Zellen (s.

2.4.4) wurden die Zellen zunächst in eiskaltem PBS gewaschen und für 10 min bei 250 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Resuspension des entstandenen Pellets in 200 µl Radioimmunpräzipitationspuffer (RIPA-Puffer) und einer anschließenden Inkubationszeit von 30 min auf Eis. Zur Homogenisierung wurde das Zelllysate mehrmals durch eine 1 ml Spritze und Sterican® G20 Kanüle (B. Braun SE, Melsungen, Deutschland) gegeben und die Proteine durch 20-minütige Zentrifugation bei 12 000 x g und 4 °C von den restlichen Zellbestandteilen separiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Zuhilfenahme des Pierce™ BCA Protein Assay Kits nach Herstellerangaben. Für die SDS-PAGE wurden jeweils 5 µg Protein im Verhältnis 1:1 mit Laemmli-Puffer (inklusive 5 % Mercaptoethanol) verdünnt und auf ein denaturierendes 10 % Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gel aufgetragen. Als Größenstandard diente der Proteinmarker IV. Die Gelelektrophorese wurde in Laufpuffer für 1 h bei 100 V gestartet. Im Anschluss erfolgte im Trans-Blot Turbo System die Übertragung der Proteine auf eine 0,2 µm PVDF-Membran. Um unerwünschte, unspezifische Antikörperfärbungen auszuschließen, wurden vor der Immundetektion freie Stellen auf der Membran für 1 h mit TBST + 5 % BSA-Puffer blockiert. Im Anschluss erfolgte nach dreimaligen Waschen der Membran mit TBST die Inkubation des ersten Antikörpers (Tab. 2.4), verdünnt in TBST + 5 % BSA-Puffer über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen der Membran in TBST wurde diese für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in TBST + 5 % BSA-Puffer, inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden auf der TBST gewaschenen Membran erfolgte mit dem Clarity Western ECL-Substrat in einem ChemiDoc-Imaging-System.

Die *EndoH*-Behandlung von T-Zellen erfolgte mit Hilfe der *Endoglykosidase H* gemäß den Herstellerangaben. Dabei wurden zu 10 µg der lysierten T-Zellen 2500 Einheiten *EndoH* gegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur behandelt. Die Auftrennung und der Nachweis der Proteine fand analog wie oben beschrieben mittels SDS-PAGE statt.

2.2.10 Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Co-Immunpräzipitation ist eine Methode zur Identifizierung physiologisch relevanter Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dabei werden spezifische, gegen das Zielprotein gerichtete Antikörper mit bspw. Dynabeads®, magnetischen Kügelchen, gekoppelt und erlauben so die Separierung von Proteinkomplexen aus beispielsweise Zelllysaten. Diese Komplexe (Immunpräzipitate) können im Anschluss mittels Western Blot auf assoziierte Proteine hin analysiert werden.

Die Co-IP wurde mit Hilfe des Dynabeads™ Co-Immunoprecipitation Kits gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 10 µg des Anti-TAS1R3 bzw. Anti-mGluR2 Antikörpers (Tab. 2.4) kovalent an die Dynabeads® gekoppelt. Für die anschließende Zellyse

und SDS-PAGE wurde analog wie unter 2.2.9 beschrieben verfahren, mit einem zusätzlichen Zentrifugationsansatz bei 15 000 x g nach der PMN-Zellyse, um zu gewährleisten, dass membranäre Strukturen und alle ungelösten Rezeptoren entfernt wurden [459].

2.2.11 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine antikörperbasierte Methode, die mittels enzymatischer Farbreaktion lösliche Substanzen wie Proteine oder Antikörper detektieren kann. Hierbei wird das Zielmolekül, in diesem Fall Interleukin-8 (IL-8), über einen Antikörper an eine Mikrotiterplatte immobilisiert und im Anschluss über einen zweiten Antikörper, der ein Reporterenzym, hier eine *HRP* (engl. *Horseradish Peroxidase*) trägt, detektiert. Der Antigennachweis und dessen Quantifizierung erfolgt über die durch das Reporterenzym vermittelte Umsetzung eines Substrats in ein Produkt, dessen optische Dichte in einem Mikroplattenreader detektiert und ausgelesen werden kann.

Für den Nachweis von IL-8 aus stimulierten PMNs (s. 2.4.1) wurde das Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Auswertung erfolgte in einem Mikroplattenphotometer Infinite M200 bei 450 und 540 nm mit anschließender Wellenlängenkorrektur durch Subtraktion der OD₅₄₀- von den OD₄₅₀-Werten. Durch Auftragen der Absorptionwerte eines IL-8 Standards (x-Achse) gegen dessen bekannte Konzentrationen (y-Achse) wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die IL-8 Konzentrationen der jeweiligen Proben mittels Regressionsanalyse bestimmt wurden. Für jede Behandlung wurden die Zellen in Duplikaten gemessen und auf die Negativkontrolle (RPMI-Medium ohne Stimuli) normiert. Die Nachweisgrenze für IL-8 lag bei 31,3-2000 pg/ml. Die Konzentrationen der eingesetzten Antagonisten wurden basierend auf Studien von *Shu et al.* [460] (mGluR2 Antagonist 1) und *Malki et al.* [222] (Lactisol) gewählt.

2.2.12 Molekulare Klonierung von Rezeptoren und G-Proteinen

Die molekulare Klonierung zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA für spätere Transfektionen (s. 2.4.4) umfasste in dieser Arbeit die Transformation kompetenter *Escherichia coli* Bakterien, deren Vervielfältigung mittels Schüttelkulturen und die anschließende Isolation und Sequenzierung der Plasmid-DNA. Die Rezeptoren und G-Proteine lagen bereits in den geeigneten Vektoren vor bzw. wurden im Verlauf dieser Arbeit mittels Gensynthesen hergestellt (Tab. 2.6), sodass eine Amplifikation und Klonierung in das entsprechende Expressionsplasmid nicht durchgeführt werden musste.

2.2.12.1 Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen

Unter Transformation versteht man in der Molekularbiologie die Übertragung freier DNA in Form eines Vektorplasmids in kompetente Bakterienzellen zur Vervielfältigung von gewünschter DNA. Dazu wurde 1 µl Plasmid-DNA (Tab. 2.6) zu XL-1 Blue superkompetenten *E. coli*-Zellen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen anschließenden Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C kommt es zur Bildung von Löchern in der bakteriellen Zellmembran und der Aufnahme des Plasmids in die Zelle. Die folgende Vorkultivierung der transformierten Bakterien erfolgte für 2 h bei 37 °C und 250 U/min mit SOC-Wachstumsmedium.

2.2.12.2 *E. coli* Schüttelkultur und Isolation von Plasmid-DNA

Nach 2-stündiger Vorkultivierung der transformierten Bakterien wurden diese in Schikankolben mit 250 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin überführt und in einem Schüttelinkubator KS 4000 i control für 20-24 h bei 37 °C kultiviert. Die Pelletierung der Bakterien erfolgte im Anschluss bei 4350 rpm für 10 min, die Isolation der Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Pure Yield™ Plasmid Midiprep Systems nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Einstellung der DNA-Konzentration mit nukleasefreiem Wasser auf 250 ng/µl erfolgte anhand des NanoDrop™ One Spektrometers. Für die weitere Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

2.2.12.3 DNA-Sequenzierung

Um eine korrekte Sequenz der generierten Plasmid-DNAs zu gewährleisten, wurden diese im Anschluss an deren Isolierung durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) mittels der Sanger-Methode sequenziert. Dazu wurden 1,5 µg DNA mit 1 µmol/L des entsprechenden vektorinternen Oligonukleotids (Tab. A.3) vermischt und mit nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 15 µl angeglichen.

2.3 Methoden der Bioinformatik

Die Nukelotid- und Proteinsequenzen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren und G-Proteine entstammten der NCBI (National Center for Biotechnology Information) Datenbank [461]. Der Abgleich der Sequenzen mit den Sequenzierdaten der Plasmid-DNAs (s. 2.2.12.3) erfolgte mit Hilfe des Programms CLC Sequence Viewer 8. Das Gleiche galt für das Erstellen von Sequenzalignments, der Analyse verschiedener Isoformen, Berechnungen von Aminosäureidentitäten und dem Design von Oligonukleotiden.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von PMNs für Stimulationsstudien

STIMULATION FÜR GENEXPRESSIONSANALYSEN Für die Analyse der Genexpression von PMNs nach Stimulation mit MSG wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben isoliert, für 10 min bei 300 x g pelletiert und in 50 ml RPMI-Medium mit 50 µmol/L MSG resuspendiert. Die Inkubation erfolgte in einem MACSmix™ Tube Rotator für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂, die Lagerung des Zellpellets bei -80 °C.

STIMULATION FÜR IL-8 ELISA Für die Analyse der IL-8 Sekretion von PMNs mittels ELISA (s. 2.2.11) wurden die Zellen nach ihrer Isolation (s. 2.2.1) gezählt, pelletiert und mit 50 µmol/L MSG, 40 nmol/L mGluR2 Antagonist 1 bzw. 0,3 µmol/L Lactisol in RPMI-Medium versetzt. Die Präinkubation erfolgte in 96-Wellplatten à 100 000 Zellen/Well für 2 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂. Für die Bestimmung der Zellzahl kam eine Neubauer Zählkammer zum Einsatz. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 300 x g wurden die Zellen mit RPMI-Medium gewaschen und nach erneuter analoger Zentrifugation das Pellet in RPMI-Medium inklusive Zusatz der entsprechenden pharmakologischen Hemmern (mGluR2 Antagonist 1 bzw. Lactisol) resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von fMLF in den Konzentrationen von 0,01 – 10 nmol/L und die Inkubation für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Zentrifugation der Zellen für 10 min bei 300 x g wurden die Zellüberstände vorsichtig abgenommen, in eine neue 96-Wellplatte überführt und verschlossen bei -20 °C für die Durchführung des ELISAs gelagert.

2.4.2 Kultivierung von HEK-293 und NxG Zellen

HEK-293 ZELLEN Bei HEK-293 Zellen handelt es sich um humane embryonale Nierenzellen (*engl. ‚Human Embryonic Kidney‘*), die in den 1970er Jahren durch Transfektion mit DNA-Buchstücken des menschlichen Adenovirus 5 generiert wurden [462].

Die Kultivierung von HEK-293 Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM (4,5 g/L D-Glukose), das mit 10 % FBS, 2 mmol/L L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin versetzt wurde.

NxG 108CC15 ZELLEN Bei NxG 108CC15 Zellen handelt es sich um eine Zelllinie, die durch Fusion von Neuroblastoma- und Gliomazellen von Maus und Ratte unter Verwendung eines inaktivierten Sendai-Virus generiert wurde (*engl. Neuroblastoma x Glioma*) [463].

Die Kultivierung von NxG Zellen erfolgte bei 37 °C und 7 % CO₂ in DMEM (4,5 g/L D-Glukose), das mit 10 % FBS, 4 mmol/L L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin und HAT-Mediumzusatz (50x) versetzt wurde.

Beide adhärennten Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von etwa 70 % mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %/0,02% in PBS) vom Boden der 15 cm Zellkulturschale abgelöst, in 10 ml frisches, 37 °C warmes Zellkulturmedium aufgenommen und für 3 min bei 250 x g zentrifugiert. Nach Resuspension des erhaltenen Zellpellet mit frischem Zellkulturmedium erfolgte die Aufteilung der Zellen im Verhältnis 1:4 bis 1:10 auf neue Zellkulturschalen.

2.4.3 Langzeitlagerung von HEK-293 und NxG-Zellen

Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen für 3 min bei 250 x g pelletiert, in ihrem entsprechenden Kulturmedium (s. 2.4.2) mit 11 % steril filtriertem DMSO Zusatz resuspendiert und in 2 ml Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte im Anschluss zunächst für 24 h und - 80 °C in einem Kryogefrierbehälter und danach bei -196 °C flüssigem Stickstoff.

2.4.4 Transiente Transfektion

Bei der transienten Transfektion handelt es sich um eine Methode, mit deren Hilfe Fremd-DNA für einen begrenzten Zeitraum in Zellen eingebracht wird, ohne dass eine Integration ins Genom erfolgt. Dabei führt die hohe Kopienzahl des eingebrachten genetischen Materials in heterologen Zellen zu einer Proteinexpression, die im Anschluss untersucht und mittels zellbiologischer Methoden analysiert werden kann.

24 Stunden vor der Transfektion wurden die HEK-293 Zellen mit einer Zellzahl von 12 000 Zellen/Well, bestimmt mittels Neubauer Zählkammer, in 96-Well-Platten ausgesät. Für die Transfektion, die basierend auf einer kationischer Lipofektion erfolgte, wurde das Reagent Vi-aFect™ verwendet. Dazu wurden 100 ng/Well Rezeptor-, 50 ng/Well $G_{\alpha i}$ -Protein- sowie 50 ng/Well einer genetisch modifizierten Luziferase-Plasmid-DNA (pGloSensor™-22F cAMP Plasmid) [464] verwendet [465]. Für Heterodimerisierungsstudien wurden je 50 ng der beiden Rezeptor-DNAs transfiziert. Die Transfektion der entsprechenden Homodimere erfolgte analog mit je 50 ng Rezeptor-DNA und 50 ng Mock. Als Negativkontrolle diente ein Leerplasmid (pfN210A), dem die codierende Region eines Rezeptorgens fehlte (Mock-Kontrolle).

Für Studien mit dem Geruchsrezeptor OR11A1 wurde zusätzlich Plasmid-DNA des Rezeptor-transportproteins RTPS1 [466] transfiziert. Als G-Protein diente hier $G_{\alpha olf}$ [100, 101], die jeweiligen Konzentrationen der einzelnen Transfektionskomponenten blieben die gleichen.

Die Transfektion von NxG-Zellen für die Antikörpervalidierung im Zuge des Western Blots (s. 2.2.9) erfolgte in einer 15 cm Zellkulturschale. Dazu wurden 24 h vor der Transfektion 1 Millionen Zellen in einer Zellkulturschale in 10 ml Zellmedium kultiviert. Per Transfektion mit Vi-aFect™ wurden 10 µg Rezeptor-Plasmid-DNA in die NxG-Zellen eingebracht. Der Ablauf der Transfektion pro Well bzw. pro Zellkulturschale ist nachfolgend aufgeführt.

Transfektionsprotokoll von HEK-293 Zellen (pro Well)	Transfektionsprotokoll von NxG-Zellen (pro 15 cm Zellkulturschale)
50 µL serumfreies DMEM	500 µl serumfreies DMEM
100 ng Rezeptor-Plasmid-DNA	10 µg Rezeptor-Plasmid-DNA
50 ng G-Protein Plasmid-DNA	
50 ng pGloSensor™-22F cAMP Plasmid-DNA	
(50 ng RTP1-Plasmid-DNA; für <i>OR11A1</i>)	
Ansatz vermischen	
0,75 µl ViaFect™	20 µl ViaFect™
Mischen und Inkubation bei Raumtemperatur für 18 min	
Zugabe auf die Zellen und Inkubation für 42 h bei 37 °C und 5 % CO ₂	

Das Zellkulturmedium wurde etwa 24 Stunden nach Transfektion entfernt und durch frisches ersetzt. Für PTX-Analysen wurden 0,5 µg/ml PTX dem Medium zugegeben.

2.4.5 cAMP-Lumineszenzassay

Die Durchführung des cAMP-Lumineszenzassays erfolgte nach dem Grundprinzip von *Noe et al.* [465], mit für die Messung einer G_{αi}-vermittelten Signaltransduktion angepassten Parametern: 42 h nach Transfektion (s. 2.4.4) wurden die Zellen mit physiologischem Salzpuffer, bestehend aus 140 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L D-Glukose (pH 7,5) und 2 %-igem D-Luziferin beladen und für 50 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lumineszenzmessung erfolgte in einem GloMax® Discover Microplate Reader. Dabei wurden pro Well zunächst drei Basalwerte gemessen, bevor im Anschluss nach Agonistenzugabe, inklusive 2,5 µmol/L Forskolin, eine Echtzeitmessung über 21 Minuten erfolgte. Anders als im cAMP-Lumineszenzassay nach *Noe et al.* [465], der für Geruchsrezeptoren, basierend auf einer G_{αs}-vermittelt Signaltransduktion etabliert ist, wurden hier die transfizierten Zellen zusätzlich mit dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin stimuliert, der die Messung eines cAMP-Signals gewährleistet [467]. Durch Bindung an denselben Spalt der Adenylatzyklase, der das aktive Zentrum des Enzyms enthält, trägt Forskolin durch Konformationsänderungen zur Stabilisierung und vereinfachten cAMP-Synthese bei, erhöht zusätzlich die katalytische Aktivität und wirkt so der G_{αi}-vermittelten Inhibition der Adenylatzyklase entgegen [468-470].

Die cAMP-Lumineszenzmessungen für den OR11A1 erfolgten nach *Noe et al.* [465]. Dabei wurden zu Beginn pro Well drei Basalwerte gemessen, bevor im Anschluss nach Agonistenzugabe eine Inkubation von 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte und schließlich pro Well drei Messwerte dokumentiert wurden.

THEORETISCHER HINTERGRUND Das GloMax® Discover Detektionssystem ermöglicht die Messung des, in Abhängigkeit einer Rezeptoraktivierung vermittelten Signalkaskade, ansteigenden intrazellulären cAMP-Signals. Dabei wird durch Einsatz einer, mit einer cAMP Binde-stelle ausgestatteten, modifizierten Luziferase das Substrat D-Luziferin ((S)-2-(6-Hydroxy-2-benzothiazolyl)-2-thiazolin-4-Carbonsäure, $C_{11}H_8N_2O_3S_2$) in Oxyluziferin oxidiert, welches als Lumineszenzsignal detektierbar und in Form einer Echtzeitmessung aufgenommen und aus-gewertet werden kann (Abb. 2.1) [465].

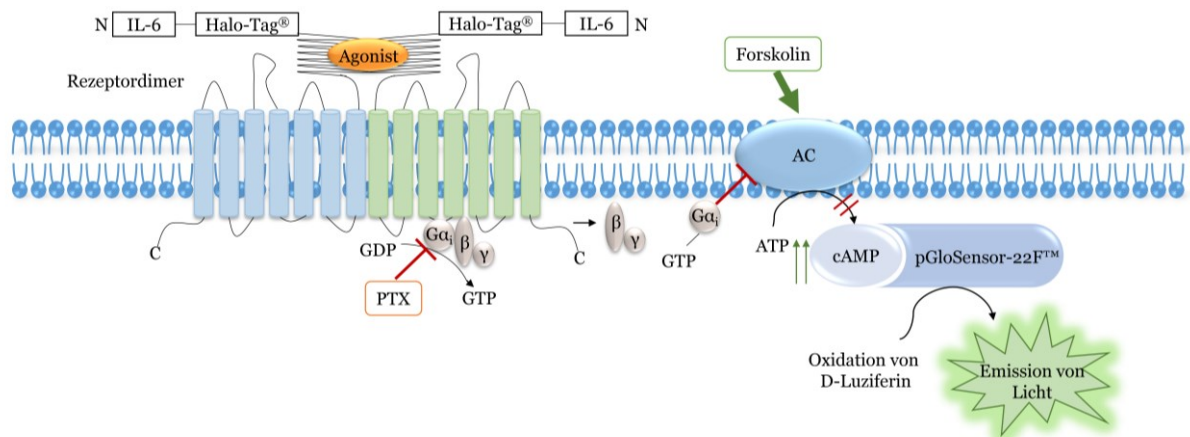


Abbildung 2.1: Schema der Signaltransduktion im heterologen Zellsystem. Eine Interaktion von Agonist und Rezeptor führt zu einer Abspaltung der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit vom heterotrimeren G-Protein. Durch zusätzliche Zugabe von Forskolin kommt es zu einer Aktivierung der durch $G_{\alpha i}$ inhibierten Adenylatzyklase (AC) und zur Bildung und dem Anstieg von intrazellulärem cAMP. Dieser sekundäre Botenstoff bindet im Folgenden an die co-transfizierte, cAMP-sensitive Luziferase (pGloSensor™-22F [464]), die daraufhin das eingesetzte D-Luziferin unter Emission von Licht oxidiert. Das N-terminale IL-6-Halo-Tag®-Konstrukt dient zur verbesserten Oberflächenexpression der Rezeptoren [465, 471, 472]. PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung der $G_{\alpha i/o}$ -Untereinheit, verhindert dadurch dessen Interaktion mit dem Rezeptor [473] und führt folglich zum Ausbleiben eines cAMP-Signals. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

Die *Photinus pyralis* Luziferase besteht aus zwei Domänen, der größeren N-terminalen und der kleineren C-terminalen, die durch ein flexibles Linker-Peptid verbunden sind, wodurch ein Spalt zwischen den beiden Domänen entsteht. Durch Bindung ihres Substrates, dem D-Luziferin, kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms, sodass der Spalt geschlossen wird. Das pH sensitive Enzym kann so Lichtemissionen im gelb-grünen Bereich zwischen 550 und 750 nm katalysieren [475]. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten cAMP-Lumineszenzassays kam eine genetisch modifizierte *Photinus pyralis* Luziferase zum Einsatz (pGlo-Sensor™-22F). Diese besteht aus einer zusätzlichen allosterischen cAMP-Bindedomäne im Bereich des Linker-Peptids, wodurch die Lumineszenz durch Konformationsänderungen dieser Domäne moduliert werden kann. Dazu wurde die cAMP-Bindungsdomäne B der regulatorischen Untereinheit Typ IIβ der Proteinkinase A mittels Peptid-Linkern zwischen die Fragmente 234-544 und 4-233 der Luziferase fusioniert (RIIβB) (Abb. 2.2) [476, 477].

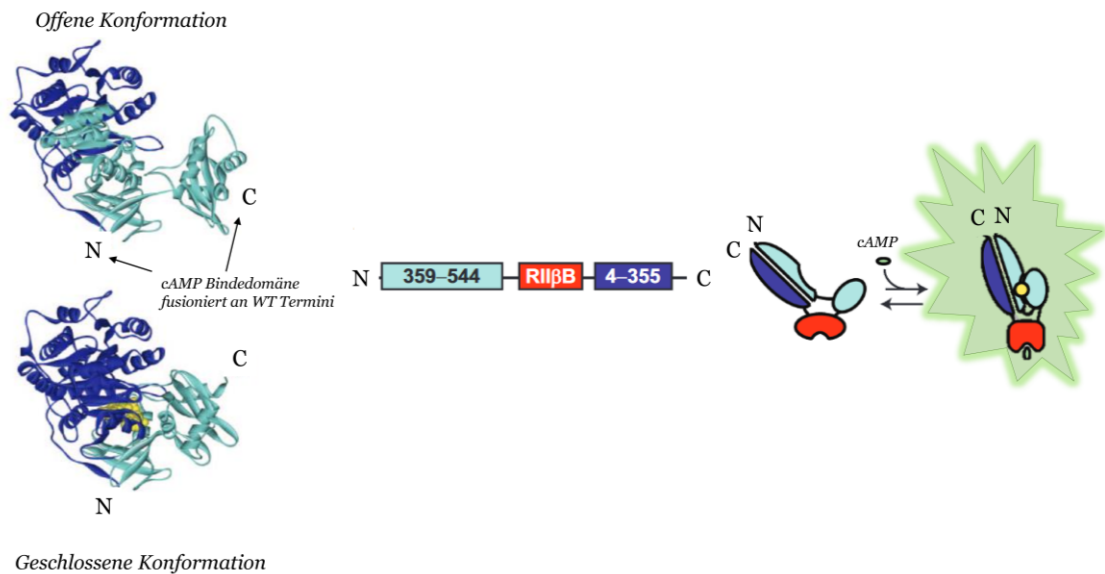


Abbildung 2.2: Abbildung der *Photinus pyralis* Luziferase (hellblau-lila) in offener und geschlossener Konformation fusioniert mit cAMP-Bindedomäne (rot). RIIβB = cAMP Bindungsdomäne B von Protein-kinase A (Untereinheit IIβ). Abbildung modifiziert nach Fan et al. (2008) [476].

Die Umsetzung von D-Luziferin in Oxiluziferin (Abb. 2.3) beginnt mit der Reaktion von D-Luziferin mit ATP unter Beteiligung der Phosphatgruppen von ATP und der Carboxylgruppe am C₄-Kohlenstoffatoms des Thiazolrings des D-Luziferins, wobei Pyrophosphat (PP_i) freigesetzt und die Carboxylgruppe des D-Luziferins adenyliert wird. Dadurch entsteht Luziferyladenylat, ein enzymgebundenes Zwischenprodukt, durch dessen Aktivierung es zur Abspaltung eines Wasserstoffatoms am C₄-Kohlenstoff und zur Generierung eines Carbanions kommt. Dieses wird im Anschluss von molekularem Sauerstoff nukleophil angegriffen, was zur Bildung eines linearen Hydroperoxids führt. Die darauffolgende Verdrängung von AMP führt zum intramolekularen, nukleophilen Angriff der zur Bildung eines cyclischen Intermediats (Luziferin Dioxetanon) erforderlichen α-Hydroperoxygruppe. Aufgrund der hohen Energie dieses Intermediats, zerfällt dieses unter Bildung von CO₂ in Oxyluziferin, das sich in einem Singulett-angeregten Zustand befindet und dessen Zerfall in den Grundzustand ein Photon freisetzt [475].

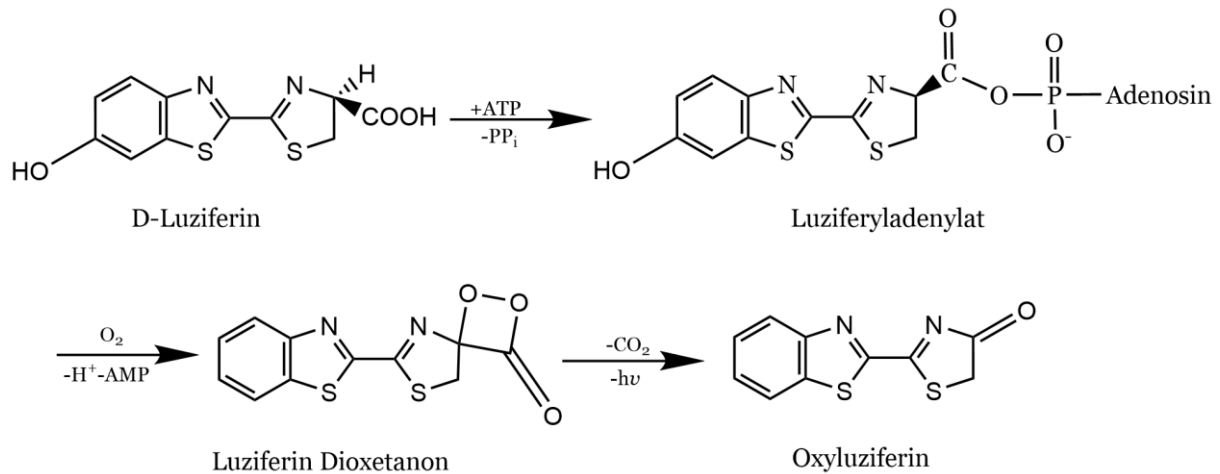


Abbildung 2.3: Biolumineszenzreaktion der *Photinus pyralis* Luziferase.

AUSWERTUNG DES cAMP-LUMINESZENZASSAYS Das GloMax® Discover Detektionssystem lieferte die Rohdaten der cAMP-Lumineszenzmessungen in Form von Microsoft Excel Tabellen. Bei Messungen, die einer $G_{\alpha i}$ -vermittelten Signalkaskade unterlagen, wurden die jeweiligen Datenpunkte der 3 Basalwerte sowie der Werte nach Agonistenzugabe (2 Werte (höchste Werte am Signalplateau)) gemittelt und im Anschluss der Basalwert vom jeweils gemittelten Lumineszenzsignal subtrahiert.

Für Konzentrations-Wirkungsbeziehungen wurden Messungen aus mindestens 3 unabhängigen Transfektionsexperimenten in Triplikaten durchgeführt, im Anschluss deren Basalwertkorrigierte Daten auf die Maximalamplitude des applizierten Agonisten normalisiert und die daraus entstandenen relativen Lumineszenzeinheiten (RLU, *engl.* Relative Luminescence Units) der gemittelten Einzelexperimente gegen die eingesetzten Agonistenkonzentrationen aufgetragen. Die Bestimmung der IC_{50} -Werte (effektive Konzentration bei halbmaximaler Rezeptorinhibition) und Kurven (Abb. 2.4) erfolgte mittels nicht-linearer Regression mit dem Programm SigmaPlot 14.0 unter Verwendung der nachfolgenden Formel [478]. Zusätzlich wurden für alle gezeigten Mittelwerte die entsprechenden Standardabweichungen bestimmt.

$$f(x) = \min + \frac{(\max - \min)}{1 + (x/IC_{50})^{-\text{hillslope}}} \quad (3)$$

Für Screening-Experimente mit bakteriellen Überständen bzw. Aminosäuren erfolgte die Basalwertkorrektur der gemessenen Lumineszenzsignale nach demselben Prinzip wie oben beschrieben. Auch in diesem Fall wurden Messungen aus mindestens drei unabhängigen Transfektionsexperimenten in Triplikaten zur Auswertung herangezogen. Zusätzlich wurde von den korrigierten Werten jeweils die Mock-Kontrolle abgezogen. Die Normalisierung erfolgte auf das MOD-Medium bzw. die Pufferlösung, in der die Aminosäuren gelöst waren.

Die Auswertung der Messungen des OR11A1-Rezeptors erfolgte analog der Basalwertkorrektur der Geschmacksrezeptoren. Zur Normalisierung wurde das TSB-Medium verwendet.

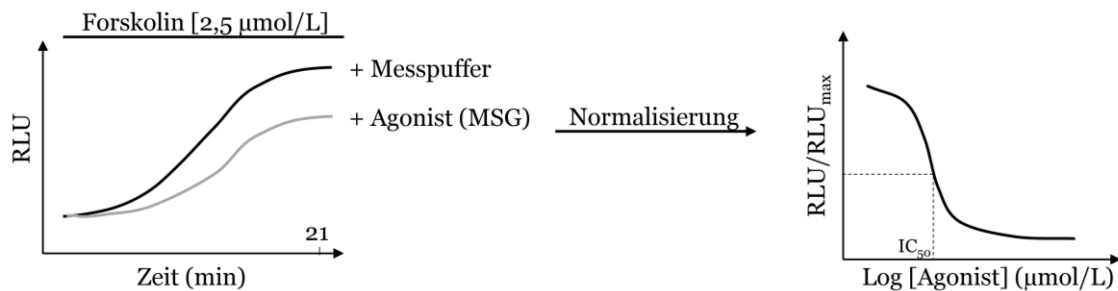


Abbildung 2.4: Experimenteller Ablauf und Normalisierung von mGluR2/TAS1R3 vermittelten Lumineszenzmessungen. Nach gleichzeitiger Stimulation der HEK-293 Zellen mit einem Agonisten und 2,5 µmol/L Forskolin erfolgte die Messung der RLU-Werte für 21 Minuten, bis zum Erreichen eines Plateaus. Im Falle einer Rezeptor-Agonist-Interaktion wurden niedrigere Werte für den Agonisten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erzielt. Jeder Datensatz wurde auf seinen maximalen Lumineszenzwert normalisiert. Aus den normalisierten Werten konnte im Anschluss eine Konzentrations-Wirkungskurve sowie der IC_{50} -Wert ermittelt werden. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

2.4.6 Quantifizierung der Oberflächenexpression von Rezeptoren

Die Quantifizierung der Zelloberflächenexpression von Rezeptoren auf transient transfizierten HEK-293 Zellen erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Dazu wurden die Zellen 24 h vor Transfektion in 12-Well-Platten mit einer Zellzahl von 96 000 Zellen/Well in je 800 µl Zellkulturmedium ausgesät. Die Transfektion erfolgte wie unter 2.4.4 beschrieben, wobei jeweils der 8-fache Transfektionsansatz verwendet wurde (800 ng/Well Rezeptor bzw. 400 ng/Well vom jeweiligen Rezeptor/Mock bei Homo- und Heterodimerisierungsstudien, 400 ng/Well G_{ai3} , 400 ng/Well der genetisch modifizierten Luziferase pGloSensor™-22F [464] und 6 µl Vi-aFect™-Transfektionsreagenz). Als Negativkontrolle diente das Leerplasmid pfN21K, dem die codierende Region des HaloTag®-Proteins fehlte (Abb. A.1). Am nächsten Tag erfolgte der Austausch des alten Kulturmediums durch 800 µl neues.

Für die Messung der Oberflächenexpression wurde die HaloTag®-Technologie verwendet [472]. 42 h nach Transfektion erfolgte das Abernten der transfizierten Zellen, die Überführung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und das Pelletieren bei Raumtemperatur für 8 min und 61 x g. Die Zellen wurden im Anschluss in 1 µmol/L HaloTag® Alexa Fluor® 488 Ligand mit 200 µl serumfreiem Medium resuspendiert und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Dabei bildet der zellmembran-impermeable Ligand spezifische, kovalente und irreversible Bindungen mit dem am Rezeptor befindlichen HaloTag® [472] und führt so zu einer Markierung der an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren (Ex/Em = 499/518 nm). Nach einstündiger Inkubationszeit wurden die Zellen erneut bei Raumtemperatur für 8 min und 61 x g zentrifugiert und in 400 µl, nach zweimaliger Wiederholung dieses Waschschritts, in 180 µl serumfreiem Medium resuspendiert. Die Oberflächenexpressionsanalyse erfolgte mit Hilfe eines MACSQuant

Durchflusszytometers. Dabei passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl mit an den Ligandenfarbstoff angepasster Wellenlänge, der dafür sorgt, dass die Elektronen des Alexa Fluor® 488 Farbstoffes angeregt und auf ein höheres Energieniveau angehoben werden. Unter Energieabgabe (Photonen) fallen die Elektronen im Anschluss an den Laserimpuls auf ihr ursprüngliches Niveau zurück. Dabei verhält sich die emittierte Photonenkonzentration proportional zur Menge markierter Rezeptoren und ermöglicht somit eine Quantifizierung. Das Gerät erstellt dazu ein Histogramm, das die Fluoreszenz auf der x-Achse und die Zellzahl auf der y-Achse abbildet. Darüber hinaus verwendet das Durchflusszytometer emittiertes Licht, um die Zellen zu zählen und verschiedene Zellpopulationen zu identifizieren. Dabei unterscheidet man zwischen Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter) und Seitenstreulicht (SSC = Side Scatter), deren Parameter jeweils vor der Messung eingestellt wurden. Der FSC wird durch Beugung von Licht erzeugt und dient als Maß für die Zellgröße, während der SSC Aufschluss über die Granularität, der Struktur und Größe des Zellkerns durch Brechung des Lichts im rechten Winkel gibt.

Die Messung für HEK-293 Zellen erfolgte mit FSC 240 V und SSC 395 V. Das FITC (Fluorescein isothiocyanate)-Signal (B1-Kanal) für den HaloTag® Alexa Fluor® 488 Liganden wurde mit 195 V aufgenommen, wobei pro Probe 10 000 Zellen in 175 µl analysiert wurden. Für die Auswertung wurde die MACSQuantify™ Software herangezogen, das jeweilige FITC-Signal der Negativkontrolle (Mock) ermöglichte die Unterscheidung von positiven und negativen Zellen.

2.5 Chemisch-Analytische Methoden

2.5.1 HPLC

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (*engl.* high performance liquid chromatography) stellt in der analytischen Chemie ein Verfahren zur chromatographischen Auftrennung von Stoffgemischen innerhalb einer Lösung dar. Dabei wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit der mobilen Phase, einem Laufmittel, kontinuierlich durch eine Chromatographiesäule, der stationären Phase, gepumpt. Durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Analyten mit der stationären Phase wandern die Stoffbestandteile ungleich schnell durch die Säule, sodass es zu einer verzögerten Elution und somit zur Auftrennung der einzelnen Substanzen innerhalb des Stoffgemischs kommt. Mit Hilfe eines nachgeschalteten Detektors werden die eluierten Moleküle detektiert und im Anschluss in Form eines Chromatogramms ausgegeben. Dabei bildet im Idealfall jeder Peak eine Komponente des Stoffgemischs ab.

Für die Auftrennung und Analyse der Bestandteile aus Fraktion 13 des bakteriellen Überstan-

des von *Pseudomonas aeruginosa* wurde als stationäre Phase eine XBridge BEH (*engl.* Ethylene Bridged Hybrid) Amid Säule gewählt. Das Säulenmaterial besteht dabei aus zwei Monomeren, Tetraethoxysilan (TEOS) und Bis-(triethoxysilyl)-ethan (BTEE), die die Auftrennung von hochpolaren Analyten ermöglichen. Um trotz der hohen Ähnlichkeit der einzelnen Substanzen innerhalb von Fraktion 13 eine Auftrennung zu erzielen, wurde eine isokratische HPLC gewählt. Dabei war während des gesamten Laufes die Konzentration des Eluenten unverändert (ohne Gradient), sodass die Wechselwirkungen zwischen stationärer und mobiler Phase konstant über die Zeit blieben. Als mobile Phase diente 78%-iges Acetonitril in Milliporewasser mit 0,1 % Ameisensäure, bei einem Druck von 5 ml/min. Als Detektor kam ein ELSD (*engl.* Evaporative Light Scattering Detector) zum Einsatz. Dieser zerlegte die eluierten Komponenten mit Hilfe von Zerstäubungsgas (Innertgas) in Nebeltröpfchen, welche in einem Driftrohr verdampften, sodass im Anschluss die Feststoffpartikel auf einen Laser zur Streuung des Lichts gerichtet wurden, welches von einer Fotodiode in Abhängigkeit der Eluentenkonzentration detektiert werden konnte [479].

Zur Auftrennung von Fraktion 13 wurden jeweils 200 µl Substanz manuell mit einer Spritze injiziert und basierend auf dem mittels Detektor erhaltenen Chromatogramm in 4 einzelne Fraktionen aufgeteilt. Auf diese Weise wurden insgesamt 7,5 ml Überstand fraktioniert, dessen einzelne Fraktionen im Anschluss per Rotationsverdampfer eingeeengt und schließlich gefriergetrocknet wurden. Für die anschließende cAMP-Lumineszenzmessung (s. 2.4.5) erfolgte im Anschluss deren Resuspension in je 7,5 ml ddH₂O, dem gleichen Volumen wie vor der Fraktionierung. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

3.1 Geosmin als Beispiel eines bakteriellen Metabolits und Geruchsstoffs aktiviert *in vitro* den Geruchsrezeptor OR11A1

3.1.1 Konzentrationsabhängige Aktivierung des humanen OR11A1 durch Geosmin

Mit einer Geruchsschwellenkonzentration (OTC, *engl.* odorant threshold concentration) von 4-10 ng/L [480-482] in Wasser besitzt der Mensch eine niedrige Wahrnehmungsschwelle für das Terpen Geosmin, welches in verschiedenen industriellen Branchen eine bedeutende Substanz darstellt, wenngleich mit unterschiedlichen Anwendungsschwerpunkten: In der Parfüm-industrie verleiht seine erdige Note in der Luft Parfüms und Pflegeprodukten einen frischen Duft [33, 34], wohingegen es in der Lebensmittelwirtschaft vielmehr darum geht, seinen unangenehmen Geschmack und Geruch zu reduzieren und auf diese Weise die Qualität von Lebensmitteln und Trinkwasser zu verbessern [43, 483].

Trotz seiner wichtigen Rolle als Auslöser von Vermeidungs- und Anziehungsverhalten sowohl bei Menschen als auch bei Tieren sind die molekularen Mechanismen der chemosensorischen Wahrnehmung von Geosmin noch vollständig unbekannt. Mit etwa 400 funktionellen Genen stellen die Geruchsrezeptoren die größte Gruppe der GPCRs dar [93, 484], die unter allen Rezeptoren am besten in der Lage sind, ökologisch relevante Gruppen flüchtiger Stoffe zu erkennen [16, 485]. Jedoch konnte Geosmin bisher keinem spezifischen Geruchsrezeptor zugeordnet werden.

In einem Rezeptorscreen bestehend aus 616 Geruchsrezeptoren konnte Herr Tim Frey (LSB) den OR11A1 als alleinigen Geruchsrezeptor für Geosmin identifizieren [486]. Konzentrations-Wirkungsbeziehungen offenbarten einen konzentrationsabhängigen Effekt der Substanz mit einem EC_{50} -Wert von $27,97 \pm 7,16 \mu\text{mol/L}$ (Abb. 3.1) [486].

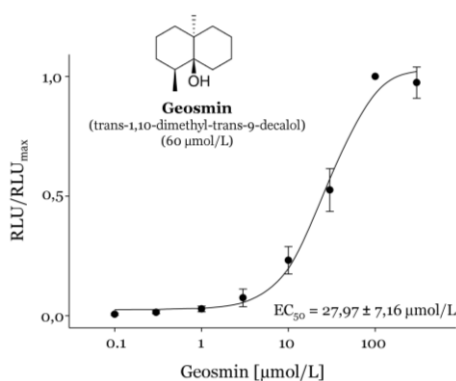


Abbildung 3.1: Geosmin aktiviert *in vitro* den humanen Geruchsrezeptor OR11A1. Konzentrations-Wirkungs-kurve für Geosmin und den humanen Geruchsrezeptor OR11A1 in transfizierten HEK-293 Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n=4$ unabhängigen Messungen nach abzogener Mock-Kontrolle, normalisiert auf das höchste Geosminsignal (100 µmol/L). Die Daten stammen von Tim Frey (LSB). Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2024) [486].

3.1.2 Orthologe des OR11A1 unterscheiden sich in großem Maße in deren Sensitivitäten und Effizienzen gegenüber Geosmin

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei Geosmin um eine wichtige Semiochemikalie zu handeln scheint, einem Botenstoff, der als chemischer Kommunikator zwischen Individuen einer oder unterschiedlicher Arten dient [487], und sowohl Anziehungs- als auch Abstoßungsreaktionen hervorrufen kann [69-72], wurden in einem nächsten Schritt die Rezeptorantworten von 6 unterschiedlichen Spezies auf Geosmin mittels Konzentrations-Wirkungsbeziehungen analysiert und deren EC₅₀-Werte bestimmt (Tab. 3.1 und Abb. A.5) [486].

Tabelle 3.1: EC₅₀-Werte von OR11A1-Orthologen gegenüber Geosmin und ihre evolutionären Beziehungen

	OR11A1 Orthologe ^a	Spezies	EC ₅₀ -Wert [µmol/L] ^b
85	doOR11A1	Känguru-Ratte (<i>Dipodomys ordii</i>)	0,24 ± 0,04
	Olf96	Maus (<i>Mus musculus</i>)	0,59 ± 0,19
100	mmOR11A1	Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)	19,63 ± 4,75
	OR11A1	Mensch (<i>Homo sapiens</i>)	27,97 ± 7,16
	96	paOR11A1	Sumatra-Orang-Utan (<i>Pongo abelii</i>)
89	umOR11A1	Eisbär (<i>Ursus maritimus</i>)	0,81 ± 0,07
	cfOR11A1	Kamel (<i>Camelus ferus</i>)	1,26 ± 0,17

^a Maximum-Likelihood-Baum mit 500 Bootstrap Werten. ^b EC₅₀-Werte sind als Mittelwerte ± SD angegeben (n = 3-5). Die Daten stammen von Tim Frey (LSB) [486].

Die vorliegenden Daten zeigten für alle der getesteten Orthologen (Känguru-Ratte, Eisbär, Kamel, Rhesus-Affe, Sumatra-Orang-Utan und Maus) eine konzentrationsabhängige Aktivierung durch Geosmin. Mit einem EC₅₀-Wert von 0.24 ± 0.04 µmol/L konnte der OR11A1 der Känguru-Ratte als der sensitivste der getesteten Rezeptoren identifiziert werden, während sich der Geruchsrezeptor des Sumatra-Orang-Utan (*Pongo abelii*) mit einem EC₅₀-Wert von 80,97 ± 33,23 µmol/L als der am wenigsten potente Rezeptor erwies (Abb. A.5) [486].

Zusätzlich zur Bestimmung der EC₅₀-Werte erfolgte die Ermittlung der Effizienz aller Orthologe in Antwort auf Geosmin (Abb. 3.2 A), wobei sich, analog zur Sensitivitätsbestimmung, doOR11A1, der Rezeptor der Känguru-Ratte, als der effizienteste OR herausstellte [486]. Die unterschiedlichen Effizienzen der OR11A1-Orthologe stehen dabei jedoch nicht im Einklang mit deren Oberflächenexpressionen. Obwohl der Rezeptor der Känguru-Ratte in der Durchflusszytometrie im Vergleich zu anderen Orthologen eine deutlich höhere Oberflächenexpression zeigte, konnten für den Rhesusaffen, den Orang-Utan sowie den Eisbären ähnliche relative Expressionswerte beobachtet werden (Abb. 3.2 B), obwohl diese eine deutlich schlechtere Effizienz und Sensitivität gegenüber Geosmin zeigten (Abb. 3.2 A und Tab. 3.1) [486].

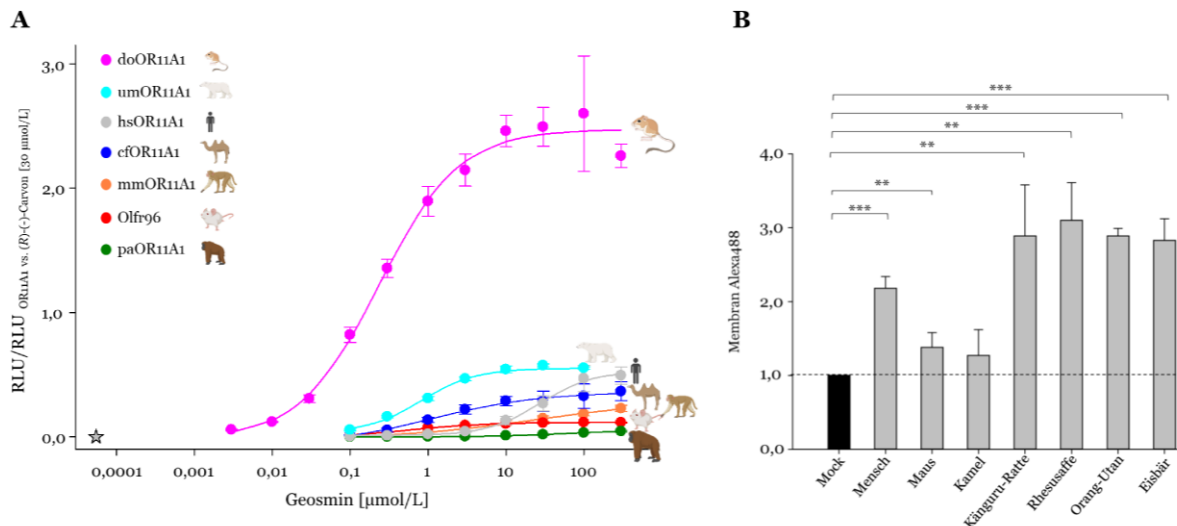


Abbildung 3.2: Orthologe von *OR11A1* unterscheiden sich in ihrer Effizienz und Sensitivität gegenüber Geosmin sowie in ihrer Oberflächenexpression A: Konzentrations-Wirkungskurven für Geosmin und *OR11A1* Orthologe in transfizierten HEK-293 Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n=3-6$ unabhängigen Messungen nach abgezogener Mock-Kontrolle, normalisiert auf die Antwort von *OR11A1* auf (R)-(-)-Carvon ($30 \mu\text{mol/L}$). do = *Dipodomys ordii*; um = *Ursus maritimus*; hs = *Homo sapiens*; cf = *Camelus ferus*; mm = *Macaca mulata*; pa = *Pongo abelii*. Der Stern gibt die menschliche Geruchsschwelle an. Icons wurden mit BioRender.com erstellt. Die Daten stammen von Tim Frey (LSB) [486]. B: Balkendiagramm zeigt relative Oberflächenexpression von *OR11A1* und seinen Orthologen. Dargestellt sind die Mittelwerte + Standardabweichungen aus $n=3-4$ unabhängigen Messungen. Signifikanz zwischen *OR11A1* und Mock-Kontrolle wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2024) [486].

3.1.3 Geosmin aus bakteriellen Kulturen aktiviert doOR11A1 in nanomolaren Konzentrationen

Geosmin wird in der Natur in erster Linie von terrestrischen Mikroorganismen produziert, darunter Streptomyzeten wie *Streptomyces albidoflavus* und *Streptomyces albus* [49, 50]. In einem nächsten Schritt sollte daher das Verhalten von *OR11A1* gegenüber dem Terpen aus bakteriellem Ursprung untersucht und die Frage geklärt werden, ob der neu identifizierte Geosminrezeptor den Geruchsstoff in Anwesenheit weiterer mikrobieller Substanzen bzw. Metaboliten detektieren kann. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Klaus Neuhaus (ZIEL) wurden von Frau Christine Fritsch beide bakterielle Stämme (Tab. 3.2) auf BHI-Agarplatten (engl. Brain Heart Infusion Agar) für 2 Tage bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert, mit 15 ml Puffer des Lumineszenz-Assays abgespült, abzentrifugiert und der jeweilige Überstand sterilfiltriert ($0,22 \mu\text{m}$ Porengröße) [486].

Tabelle 3.2: Bakterienstämme mit ihren jeweiligen Identifizierungsnummern, verwendet für das Überstandsscreening mit *OR11A1*.

Bakterienstamm	Identifizierungsnummer
<i>Streptomyces albus</i>	WS 5155
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	WS 4614

Um die Anwesenheit von Geosmin in beiden Überständen zu bestätigen und deren Konzentration zu quantifizieren, wurden diese von Frau Dr. Stephanie Frank, Frau Julia Bock und Frau Monika Riedmaier aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Martin Steinhaus (LSB) mittels aSAFE (*engl.* solvent-assisted flavor evaporation) und heart-cut GC-GC-HRMS (Gaschromatographie/hochauflösende Massenspektrometrie) unter Zuhilfenahme eines internen (²H₃)-Geosminstandards analysiert. Dabei konnte für *S. albus* eine in etwa 10-fach höhere Konzentration von Geosmin (52,3 nmol/L) im Vergleich zu *S. albidoflavus* (4,9 nmol/L) identifiziert werden (Tab. 3.3) [486].

Tabelle 3.3: Geosminkonzentrationen in Überständen von *S. albidoflavus* und *S. albus*

Probe	Konzentration [ug/L]				Konzentration [nmol/L]
	Exp. 1 ^a	Exp. 2 ^a	Exp. 3 ^a	Mittelwert ± SD (CV) ^b	
<i>S. albidoflavus</i>	0,945	0,878	0,855	0,893 ± 0,0047 (5 %)	4,9
<i>S. albus</i>	9,91	8,98	9,71	9,53 ± 0,49 (5%)	52,3
Puffer-Kontrolle	≤0,23 ^c	≤0,35 ^c	≤0,28 ^c		≤1,9

^a Jeweilige Konzentrationen wurden der Anschaulichkeit halber auf drei Stellen gerundet. ^b Mittelwerte wurden von den ungerundeten Konzentrationen der drei unabhängigen Experimente ermittelt und auf 3 Stellen gerundet. CV = Coefficient of Variation (Variationskoeffizient). ^cEs wurde kein Analytenpeak beobachtet; die Werte wurden aus der Integration des Hintergrundrauschens abgeleitet. [486].

Die Analyse der Rezeptorantwort von OR11A1 auf die bakteriellen Extrakte erfolgte mit Hilfe des *in vitro* Lumineszenz-Assays. Dazu wurden der humane OR11A1 sowie doOR11A1, der orthologe Rezeptor mit der höchsten Effizienz und Sensitivität gegenüber Geosmin herangezogen (Abb. 3.3). Bemerkenswerterweise zeigte ausschließlich der Rezeptor der Känguru-Ratte (doOR11A1) eine signifikante Antwort gegenüber beider bakterieller Überstände, die sich proportional zu den entsprechenden Geosmin-Konzentrationen aus Tabelle 3.3 verhielt. Die entsprechenden Geosmin-Kontrollen (5 nM und 50 nM) unterstrichen diesen Befund. Im Gegensatz dazu zeigte der menschliche Rezeptor keinerlei Antwort auf die bakteriellen Stimuli [486]. Beide mikrobiellen Extrakte enthalten Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich, die innerhalb des Detektionsbereichs des doRO11A1 jedoch weit unterhalb derer des menschlichen Geruchsrezeptors liegen (vgl. Abbildung 3.2 A). Gleichwohl liefert die Identifizierung von OR11A1 als spezifischer Rezeptor für Geosmin ein weiteres Puzzelteil in der Aufklärung bisher unbekannter Rezeptor-Agonist-Interaktionen und zeigt einmal mehr die unglaubliche Dimension und Vielfältigkeit von GPCRs sowie deren enormes Forschungspotential sowohl in der Geschmacks- und Geruchswahrnehmung des Menschen als auch in Bezug auf die Interaktion und Wahrnehmung von Semiochemikalien im Tierreich sowie dem gesamten Ökosystem.

Bezieht man zusätzlich zu den Expressionsorten der Geruchs- und Geschmacksorgane die ektopisch exprimierten GPCRs mit ein, bildet sich eine unvorstellbare Kombinatorik und Vielseitigkeit an Funktionen und Wirkungsweisen, die möglicherweise von noch nicht abschätzbarer Tragweite sein könnten. Ein typisches Beispiel stellt in diesem Zusammenhang die Expression von Geschmacks- und Glutamatrezeptoren auf chemorezeptorisch kompetenten Blutzellen, wie den PMNs und T-Zellen dar [212, 488]. Auf die Analyse und Charakterisierung dieser Rezeptoren soll im Folgenden eingegangen werden.

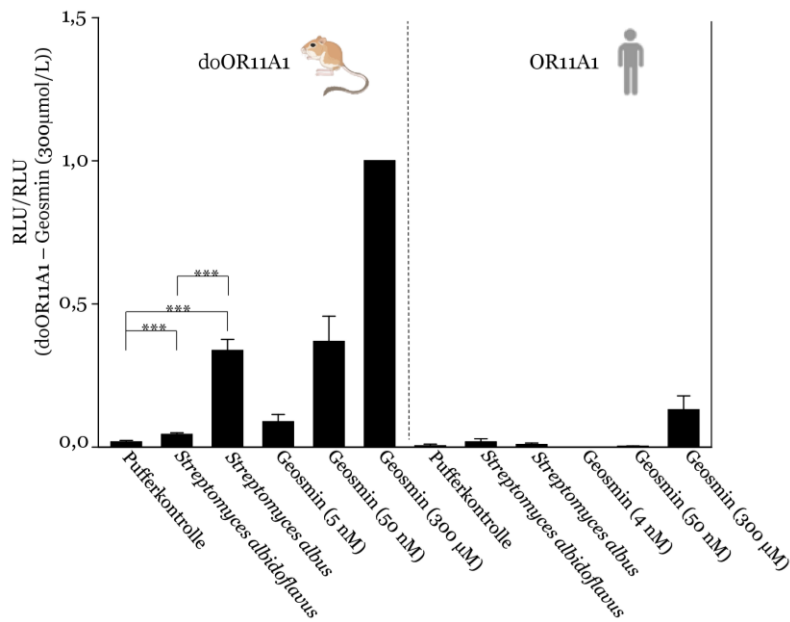


Abbildung 3.3: Geosmin bakteriellen Ursprungs aktiviert signifikant den doOR11A1-Rezeptor. OR11A1- bzw. doOR11A1- transfizierte Zellen wurden mit Überständen von *S. albidoflavus* und *S. albus* stimuliert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n=11$ unabhängigen Messungen nach abgezogener Mock-Kontrolle, normalisiert auf die Antwort von doOR11A1 auf 300 $\mu\text{mol/L}$ Geosmin. Abbildung verändert nach Ball et al. (2024) [486].

3.2 Genexpressionanalyse von GRMs und TAS1Rs in humanen PMNs und T-Zellen

Die Analyse der Expression von metabotropen Glutamatrezeptor- und TAS1R-Genen stimulierter sowie nicht-stimulierter Neutrophiler und T-Zellen erfolgte mit Hilfe der qPCR aus frischen humanen Buffycoat-Proben, die Identifizierung der Vorkommen von *GRM2*-Isoformen wurde mittels ddPCR erreicht.

3.2.1 *GRM2* und *TAS1R3* zeigen in differentieller Genexpressionsanalyse höchste Expressionsraten auf

Die differentielle Genexpressionsanalyse von *GRMs* und *TAS1Rs* in humanen Blutleukozyten zeigte die Anwesenheit aller untersuchten Rezeptorgene sowohl in PMNs als auch in T-Zellen auf (Abb. 3.4). Dabei konnte ein ähnliches Muster in den Intensitäten der Genexpressionen für PMNs und T-Zellen beobachtet werden, wobei insgesamt höhere Expressionslevel in Neutrophilen, den Zellen des inaten Immunsystems, im Vergleich zu den, dem adaptiven Immunsystem zugehörigen T-Zellen identifiziert werden konnten. Während erstere ΔCt -Werte von $5,06 \pm 1,28$ (*GRM2*) bis $11,39 \pm 1,44$ (*GRM7*) für die metabotropen Glutamatrezeptorgene aufzeigten, wurden in T-Zellen Werte von $7,06 \pm 1,26$ (*GRM2*) bis $16,56 \pm 1,05$ (*GRM7*) ermittelt. Analog dazu wiesen die *TAS1R*-Gene in PMNs mit Werten von $0,07 \pm 1,10$ (*TAS1R3*) bis $6,46 \pm 2,11$ (*TAS1R1*) ebenso eine höhere Genexpression als in den T-Zellen ($0,52 \pm 0,97$ (*TAS1R3*) bis $8,28 \pm 1,20$ (*TAS1R1*)) auf [474].

Unabhängig vom Zelltyp konnten *GRM2* und *TAS1R3* als die Gene mit den signifikant höchsten Expressionsleveln innerhalb ihrer Rezeptorfamilien identifiziert werden, die für *TAS1R3* mit ΔCt -Werten nahe null sogar auf Housekeeping-Gen Niveau einzuordnen sind. Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse einer früheren Studie von *Malki et al.*, die mittels RT-PCR die Transkripte aller *TAS1Rs* in fünf verschiedenen Zelltypen humaner Blutleukozyten aufzeigte und *TAS1R3* als das Rezeptorgen mit dem häufigsten Vorkommen (in 81-100% aller untersuchter Blutproben) identifizierte [222].

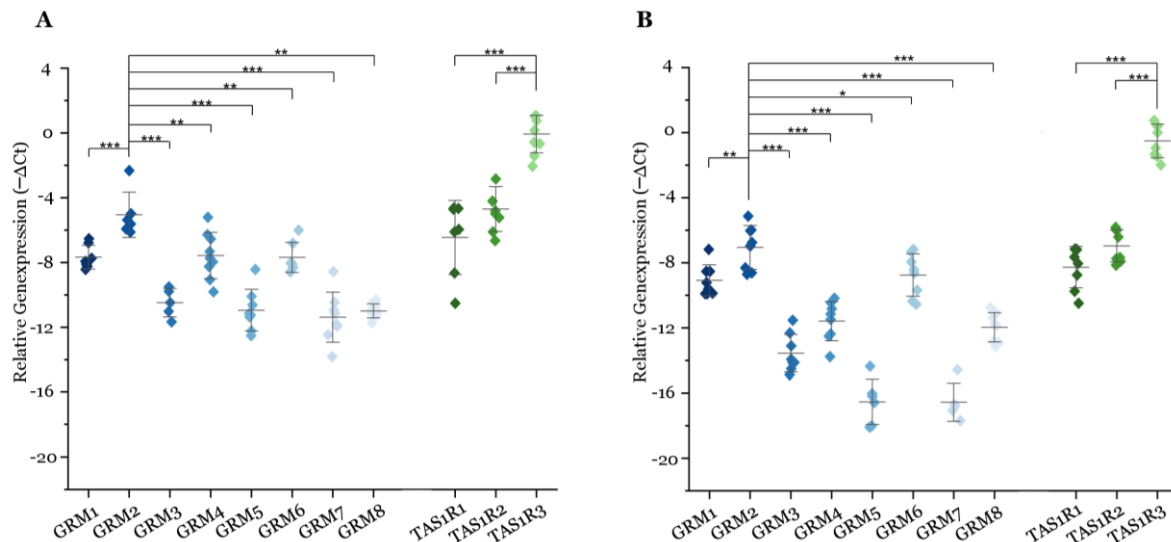


Abbildung 3.4: Genexpressionsanalyse der Rezeptorgene aller GRMs und TAS1Rs in humanen Bluteleukozyten. RT-qPCR zeigt die relative quantitative mRNA Expression aller GRM und TAS1R3-Rezeptorgene in PMNs (A) und T-Zellen (B). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n=8$ (T-Zellen)-9 (PMNs)). Daten wurden auf eine gemittelte Expression zweier Housekeeping-Gene (ACTB und GAPDH) normalisiert. Signifikanz zwischen GRM2 und den anderen GRMs bzw. zwischen TAS1R3 und den anderen TAS1R-Genen wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

3.2.2 Genexpressionsanalyse verschiedener GRM2-Isoformen offenbart NM_000839.5 als die am häufigsten vorkommende Isoform

Unterschiedliche Transkriptionsstart- und stoppstellen, alternatives Spleißen sowie Intronretention können zu mehreren verschiedenen mRNA-Isoformen unterschiedlicher Sequenzen ein und desselben Gens führen [489, 490]. Um Aufschluss über die Häufigkeiten der jeweiligen Isoformen der in der differentiellen Genexpressionsanalyse am stärksten exprimierten Gene *TAS1R3* und *GRM2* in PMNs und T-Zellen zu erhalten und diese weiter zu charakterisieren, wurden unter Zuhilfenahme der NCBI-Datenbank [461] für alle drei gelisteten *GRM2*-Isoformen (NM_001349116.2, NM_001349117.2 und NM_000839.5) isoformenspezifische Primer und Sonden designt, mit deren Hilfe ddPCR-Analysen durchgeführt wurden. Dabei konnte sowohl in den T-Zellen als auch in den PMNs Isoform NM_000839.5 als diejenige mit dem signifikant häufigsten Vorkommen ($83 \pm 2,68$ % bzw. $81 \pm 13,28$ %) identifiziert werden (Abb. 3.5) [474]. Da für *TAS1R3* nur eine Isoform (NM_152228.2) bekannt ist, beschränkte sich die Isoformenanalyse auf das Rezeptorgen *GRM2*.

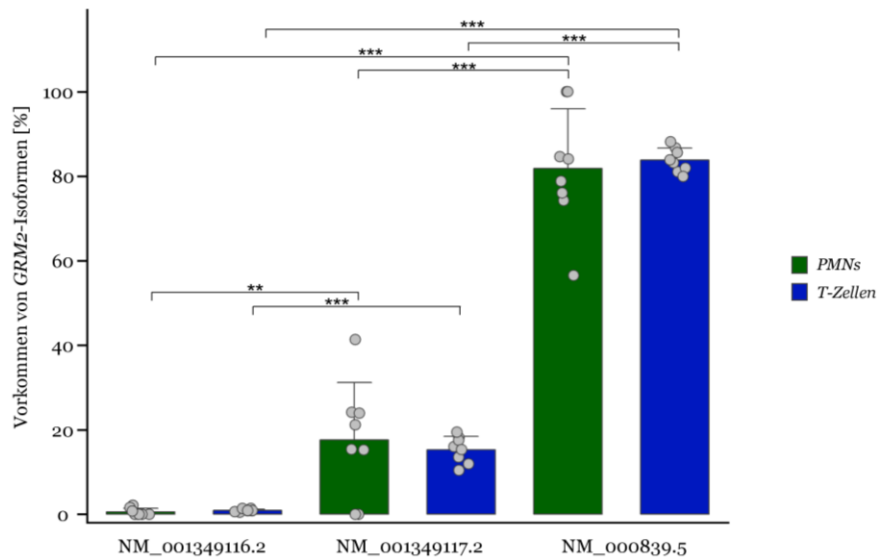


Abbildung 3.5: Genexpressionsanalyse von GRM2-Isoformen in PMNs und T-Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=8$ verschiedenen Blutproben. Signifikanz zwischen den Isoformen wurde mittels zweiseitigem gepaartem t-Test ermittelt: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

3.2.3 Erhöhte Genexpression von GRM2 und TAS1R3 nach 24-stündiger PMN-Stimulation mit Mononatriumglutamat

Im zentralen und peripheren Nervensystem bildet die Aminosäure Glutamat als exzitatorischer Neurotransmitter den wichtigsten Liganden der metabotropen Glutamatrezeptoren [491, 492] und spielt darüber hinaus als Agonist des Umami-Rezeptors TAS1R1/TAS1R3 auf der menschlichen Zunge eine wichtige Bedeutung bei der Wahrnehmung des Umami-Geschmacks [158]. Aufgrund der Tatsache, dass sich beide GPCR-Familien den gleichen Agonisten teilen, wurde der Effekt eines 24-stündigen MSG-Stimulus auf die Expression von GRM- und TAS1R-Genen in Neutrophilen, den Zellen mit den höheren RNA-Expressionsraten (Abb. 3.4), untersucht (Abb. 3.6). Dazu wurden aus Buffy-Coat-Proben isolierte PMN-Zellen für 24 Stunden mit $50 \mu\text{mol/L}$ MSG, der physiologischen Glutamatkonzentration im Blut gesunder Personen [493], stimuliert. Die RT-qPCR basierte Analyse der Genexpression im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen ergab eine 2,4-fach höhere GRM2 und eine 2,1-fach höhere TAS1R3 Expression, während für die anderen Rezeptoren nur geringere Veränderungen der Transkriptionslevel beobachtet werden konnten [474].

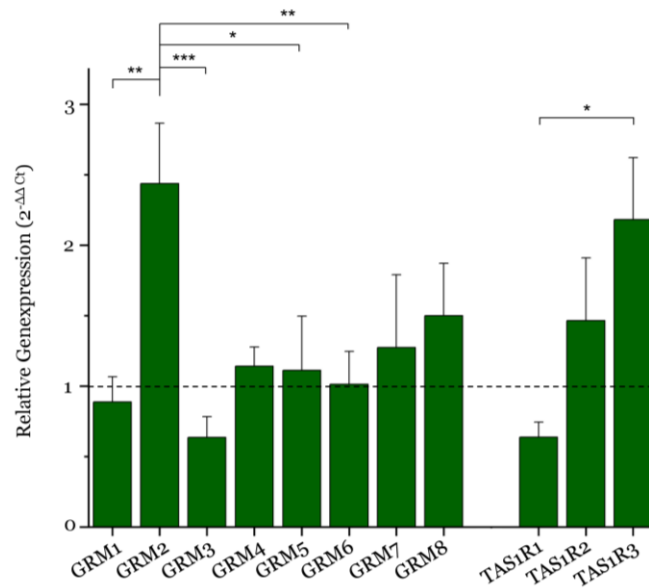


Abbildung 3.6: Relative Genexpressionswerte ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) von GRMs und TAS1Rs in PMNs nach 24-stündiger MSG-Stimulation. Gezeigt ist der Mittelwert \pm SEM von $n=8-15$ verschiedenen Blutproben. Daten wurden auf eine gemittelte Expression zweier Housekeeping-Gene (*ACTB* und *GAPDH*) normalisiert. Signifikanz zwischen GRM2 und den anderen GRMs bzw. zwischen TAS1R3 und den anderen TAS1R-Genen wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. Die gestrichelte Linie zeigt den fold change von 1, bei dem keine Veränderung der Genexpression vorliegt. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen zeigen, dass die Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3 eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen könnten. Sowohl in den Zellen des innate (PMNs) als auch adaptiven (T-Zellen) Immunsystems werden diese beiden Rezeptorgene unter den untersuchten am stärksten exprimiert (*TAS1R3* sogar auf Haushaltsgen-Niveau), deren Transkriptlevel sich nach Stimulation mit ihrem gemeinsamen physiologischen Agonisten Glutamat sogar um den Faktor 2,1-2,4 erhöhten, während die anderen Rezeptorgene aus den gleichen Familien kaum eine Änderung im Expressionsverhalten aufzeigten [474]. Um die Anwesenheit von mGluR2 und TAS1R3 auf Proteinebene zu bestätigen, erfolgte im darauffolgenden die Analyse dieser Rezeptoren in PMNs und T-Zellen unter Zuhilfenahme antikörper-basierter Nachweisverfahren (s. 3.3).

3.3 Proteinanalyse von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs und T-Zellen

3.3.1 Immunzytochemie weist Co-Expression der Proteine mGluR2 und TAS1R3 in PMNs nach

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse metabotroper Glutamatrezeptoren und TAS1Rs (s. 3.2) konnten *GRM2* und *TAS1R3* als die Rezeptorgene mit den höchsten Transkriptleveln in humanen Blutleukozyten identifiziert werden [474]. Für den Nachweis der korrespondierenden Proteine mGluR2 und TAS1R3 wurde unter Zuhilfenahme spezifischer Antikörper eine Immunzytochemie durchgeführt, um die Proteinexpression in Neutrophilen, den Zellen mit der höheren Genexpression (Abb. 3.4), nachzuweisen und visuell darzustellen. Abb. 3.7 (A-C) veranschaulicht die Verteilung der Proteine mGluR2 (pink) und TAS1R3 (grün) in PMNs. Dabei konnten für mGluR2 positive Signale in 40 %, für TAS1R3 in 39 % der untersuchten Zellen detektiert werden, die interessanterweise mit einer nahezu vollständigen Überlappung der jeweiligen Antikörpersignale einhergingen (37 % positive Zellen) (Abb. 3.7 D). Dabei konnte eine fast identische Anzahl mGluR2- bzw. TAS1R3-positiver PMNs beobachtet werden, die sich darüber hinaus mit dem Prozentsatz doppelt-positiver Zellen deckte [474].

Die Ergebnisse der Immunzytochemie weisen eindeutig auf eine Co-Expression von mGluR2 und TAS1R3 in humanen Neutrophilen hin. Während 60 % der untersuchten Zellen, die Rezeptoren nicht zu exprimieren scheinen, weisen die restlichen 40 % gleich beide Rezeptoren an ihrer Oberfläche auf, was für eine Koexistenz und möglicherweise für eine gemeinsame Funktion der beiden Rezeptoren sprechen könnte.

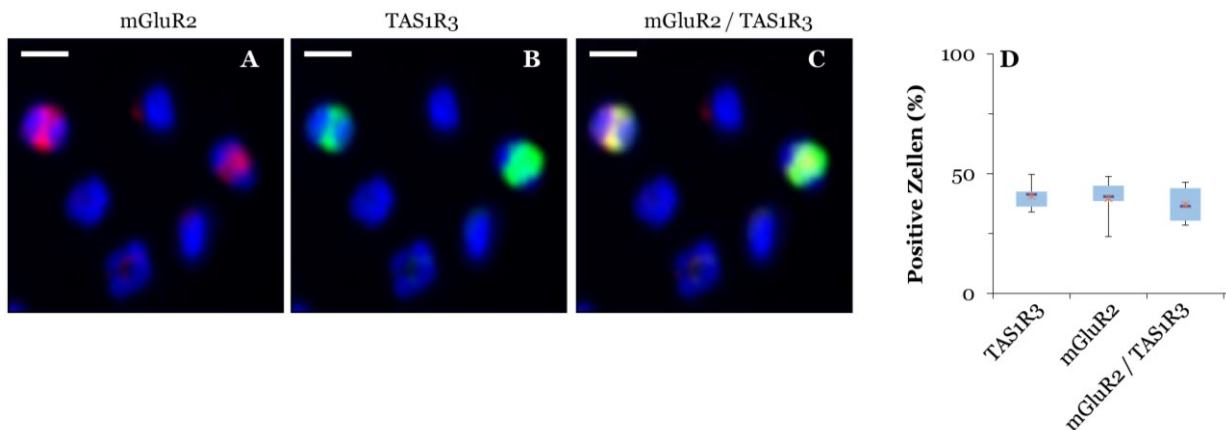


Abbildung 3.7: Zweifarbiges Immunzytochemie von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs (A-C). Analyse der Co-Expression von mGluR2 und TAS1R3 in n=6 verschiedenen Blutproben. (A) Anti-mGluR2-Antikörper und Sekundärantikörper mit Fluorophor MFP631 (rot); (B) anti-TAS1R3-Antikörper und Sekundärantikörper mit Fluorophor MFP555 (grün); (C) Überlagerung der Signale in A und B (gelb). Die Zellkerne wurden mit Hoechst-33342 (blau) gefärbt. Untersucht wurden insgesamt 3005 Zellen, Originalmaßstabsbalken 5 μ m. (D) Box-Whisker-Plots zeigen prozentuelle Anzahl rezeptorpositiver PMN-Zellen. Untere und obere blaue Balken veranschaulichen zweites und drittes Quartil der Datenverteilung, waagerechte Linie geben jeweiligen Median wieder, X entspricht den Mittelwerten. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474]. Die Immunzytochemie wurde von Julia Bauer (LSB) durchgeführt und ausgewertet.

3.3.2 Western Blot und Co-Immunpräzipitation liefern Nachweis über Proteinheterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs und T-Zellen

Abgesehen von der Tatsache, dass sich mGluR2 und TAS1R3 im Umami-Rezeptor den gleichen Agonisten, das Glutamat, teilen, deuten die Ergebnisse der Genexpressions- und Proteinanalyse darauf hin, dass unter den untersuchten Proteinen diese beiden Rezeptoren die einzigen sind, die auf diese Aminosäure mit einer erhöhten Genexpression reagieren und scheinbar ausschließlich gemeinsam in Neutrophilen co-exprimiert werden (s. 3.2.3 und 3.3.1) [474]. Basierend auf diesen Befunden wurde mittels Co-Immunpräzipitation eine potentielle Heterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in humanen Blutleukozyten untersucht, die sich als leistungsfähige Methode zum Dimerisierungsnachweis von GPCRs etabliert hat [459, 494]. Dieser antikörperbasierte Assay setzt den Einsatz spezifischer Antikörper voraus. Daher wurde in einem ersten Schritt eine Validierung der Antikörper gegen mGluR2 und TAS1R3 durchgeführt. Durch Transfektion von NxG Zellen [463] mit den entsprechenden Rezeptorplasmiden für TAS1R1-TAS1R3 sowie mGluR2 und mGluR3, konnte die Spezifität der eingesetzten Antikörper für mGluR2 (Abb. 3.8 A) und TAS1R3 (Abb. 3.8 B) bestätigt werden. Für mGluR3 konnte eine schmale, schwache Bande im Gel detektiert werden, deren Auftreten durch die hohe Sequenzidentität von mGluR2 und mGluR3 (67 %) innerhalb der Gruppe II der metabotropen Glutamatrezeptoren erklärt werden kann.

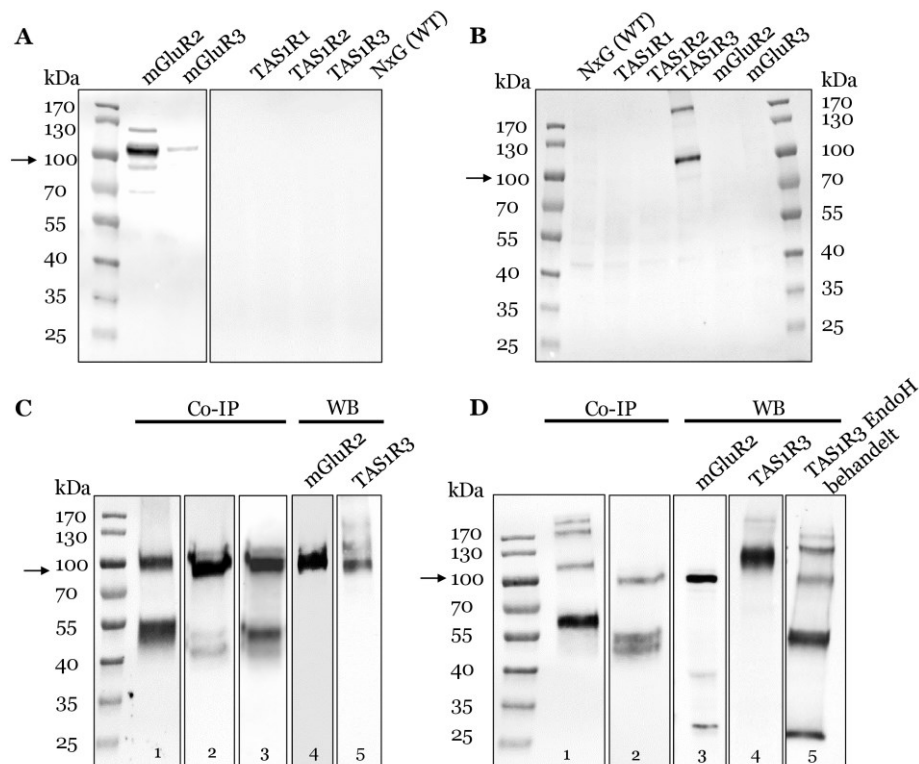


Abbildung 3.8: Proteinexpression von mGluR2 und TAS1R3 in humanen PMNs und T-Zellen. (A+B) Antikörpervalidierung des anti-mGluR2 (A) und anti-TAS1R3 Antikörpers (B) in transfizierten NxG-Zellen. 20 µg des jeweiligen Zellysats wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (C+D) Co-IP und Western

Blot von mGluR2 und TAS1R3 in PMNs (C) und T-Zellen (D). Zelllysate von n=3 verschiedenen Blutproben wurden mit Dynabeads® gekoppeltem anti-mGluR2 (jeweils Spur 1) bzw. anti-TAS1R3 (C: Spuren 2+3, D: Spur 2) Antikörper inkubiert. Spur C3 zeigt das Ergebnis nach Zentrifugation mit 15 000 g anstelle von 12 000 g. Für den Western Blot wurden die Zelllysate bzw. Immunpräzipitate der Co-IP mittels SDS-PAGE aufgetrennt und unter Verwendung eines anti-TAS1R3 (C: Spur 1+5; D: Spur 1+4+5) bzw. anti-mGluR2 (C: Spuren 2+3+4; D: Spuren 2+3) Antikörpers analysiert. Die erwartete Größe des mGluR2-Proteins liegt bei ~110 kDa, für das TAS1R3-Protein bei ~97 kDa. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

Die Co-Immunpräzipitation erfolgte durch kovalente Kopplung des anti-TAS1R3 Antikörpers an Dynabeads®, die in der anschließenden Western-Blot-Analyse mit einem anti-mGluR2 Antikörper eine Bande der entsprechenden Größe ergab (Abb. 3.8 C Spuren 2+3; D Spur 2). Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde die Co-IP wiederholt, indem der an Dynabeads® gekoppelte anti-mGluR2 Antikörper nun für den Pull-Down und der anti-TAS1R3 Antikörper für die anschließende Western Blot Analyse verwendet wurde (Abb. 3.8 C+D (jeweils Spur 1)), was erneut zu korrekten Bandengrößen führte. Um sicherzugehen, dass sowohl die Zellmembranen als auch ungelöste Rezeptoren bei der Zentrifugation vollständig entfernt werden [459], wurde für die PMNs zusätzlich ein Ansatz mit einer erhöhten Zentrifugationsgeschwindigkeit von 15 000 x g durchgeführt (Abb. 3.8 C Spur 3), der zu derselben Bande führte. Bei Vergleich der Co-IP Ergebnisse mit denen der zusätzlich durchgeführten Western Blots aus PMNs (Abb. 3.8 C) und T-Zellen (Abb. 3.8 D) konnten in allen Spuren spezifische Banden der erwarteten Größe (markiert durch schwarze Pfeile) detektiert werden. Dabei erschien in den T-Zellen die Western Blot-Bande für TAS1R3 mit etwa 130 kDa zunächst höher im Gel als erwartet. Durch Einsatz der *Endoglykosidase H*, die mannosereiche N-Glykane aus Glykoproteinen entfernt, konnte für das glykosylierte Protein TAS1R3 die erwartete Bande im Gel nachgewiesen werden [474]. Zusammen mit den Ergebnissen der Immunzytochemie weist der Befund der Co-Immunoprecipitation eindeutig auf eine Heterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in humanen Blutzellen hin. Beide Rezeptoren werden gemeinsam in PMNs Co-exprimiert und konnten mittels Co-IP als Heterodimer identifiziert werden. Daher wurde im Folgenden eine Analyse des Heterodimers im heterologen Zellsystem durchgeführt, bei der zum einen dessen Dimerisierung mittels Biolumineszenz Resonanz Energietransfer (BRET) und zum anderen die Oberflächenexpression und Funktionalität untersucht wurde.

3.4 Analyse des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 im heterologen Zellsystem

3.4.1 mGluR2 und TAS1R3 bilden heteromere Komplexe in transfizierten HEK-293 Zellen

Die Ergebnisse der Proteinanalyse von mGluR2 und TAS1R3 in humanen Blutzellen legen eine Heterodimerisierung der beiden Rezeptoren nahe (s. 3.3). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde im Anschluss mit Hilfe eines NanoBRET™ Systems [495] die Protein-Protein-Interaktionen dieser GPCRs in lebenden, transfizierten HEK-293 Zellen [462] analysiert. Durch Einsatz zweier unterschiedlicher Vektorkonstrukte, pFN210 bzw. pNsecNLuc, wurden die Rezeptoren mit verschiedenen N-terminalen Tags markiert. Dabei diente der Tag IL-6-NanoLuc® aus Vektor pNsecNLuc als Biolumineszenz-Donor, während der IL-6-HaloTag® aus pFN210A als Fluoreszenz-Akzeptor fungierte. Durch anschließende Markierung des HaloTags® mit dem Liganden NCT (nonchloro TOM) als Energieakzeptor und der Nanoluc Luziferase mit Furimazin als Donor wurden die Rezeptorinteraktionen untersucht [495]. Befinden sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe (<10 nm), kommt es zur Übertragung der Energie und zur Bildung von Fluoreszenz durch den rot-emittierenden Fluorophor des HaloTag®-Liganden, die bei 618 nm gemessen werden konnte. Eine Protein-Protein-Interaktion liegt vor, wenn die jeweiligen Rezeptorsignale über denen der beiden Negativkontrollen, gekennzeichnet als schraffierte schwarze Balken (Abb. 3.9), liegen.

Für die untersuchten Homodimere mGluR2 und TAS1R3 (blauer bzw. grüner Balken Abb. 3.9) konnten signifikant höhere mBU-Werte (milli-BRET units) im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen beobachtet werden, deren Signalintensitäten in Bezug auf das mGluR2-Dimer sogar vergleichbar mit denen der Positivkontrolle waren. Die Analyse der beiden heterodimeren Konstrukte von mGluR2 und TAS1R3 (dunkelblaue Balken Abb. 3.9) wiesen analog zu den Homodimeren signifikant höhere Signalintensitäten als die der Negativkontrollen auf, die vergleichbar mit denen des TAS1R3-Dimers ausfielen [474]. Dieses Ergebnis unterstreicht die Befunde der Immunzytochemie und Co-IP. Sowohl in den Blutzellen als auch in transfizierten HEK-293 Zellen konnte eine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden, die das Vorliegen eines Heterodimers von mGluR2 und TAS1R3 untermauert. Basierend auf diesen Erkenntnissen und Analysen wurde in einem nächsten Schritt der Fokus auf Untersuchung der Funktionalität dieses Heterodimers gelegt. Dazu wurde zunächst die Oberflächenexpression der jeweiligen Rezeptordimere auf HEK-293 Zellen [490] analysiert und im Anschluss mittels Lumineszenzassays die Interaktion mit dem gemeinsamen Agonisten, dem Mononatriumglutamat, beobachtet.

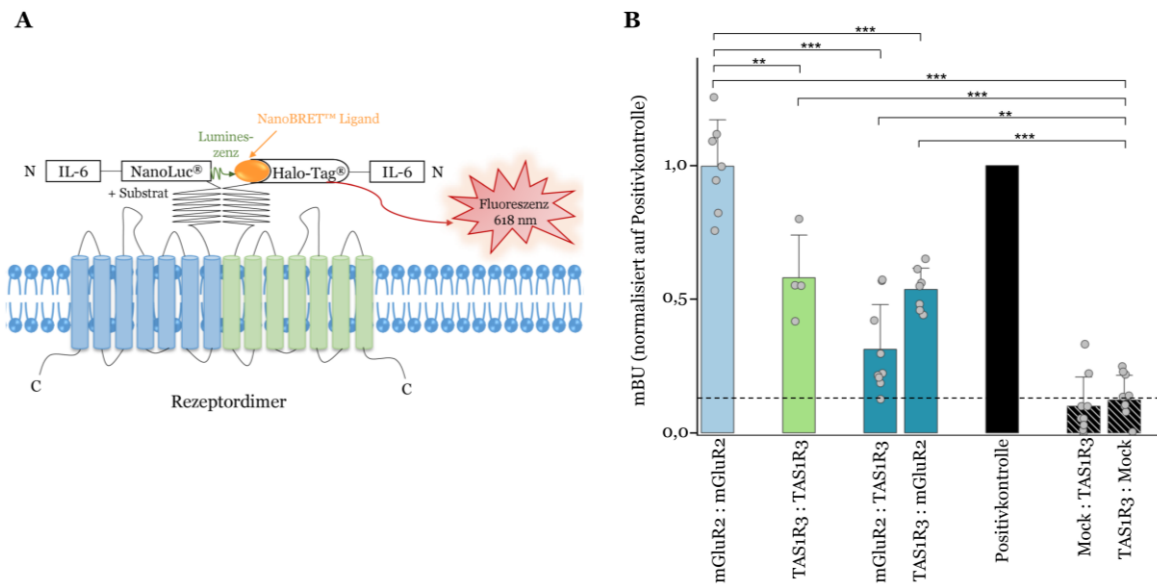


Abbildung 3.9: Mittels BRET detektierte Heterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in transfizierten HEK-293 Zellen. (A) Schematisches Prinzip des NanoBRET™ Systems. Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen, in diesem Fall zwischen zwei Rezeptoren, erfolgt durch Energieübertragung der am N-Terminus befindlichen NanoLuc®-Luziferase (Biolumineszenz-Donors) des Rezeptors A auf den am N-Terminus von Rezeptor B befindlichen HaloTag®, dessen HaloTag®-Ligand als Energieakzeptor fungiert. Befinden sich Donor und Akzeptor in unmittelbarer Nähe, kommt es zur Bildung von Fluoreszenz durch den rot-emittierenden Fluorophor des HaloTag®-Liganden, die bei 618 nm gemessen werden kann [495]. (B) Ergebnisse der BRET-Analyse. Der zuerst genannte Rezeptor wurde im Vektor pFN210A, der zweitgenannte in pNsecNLuc exprimiert. Dargestellt sind die Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung von n=4-11 unabhängigen Experimenten. Normalisiert wurde auf die Positivkontrolle (PPI p53-pFN : MDM2-NL). Die gestrichelte Linie gibt den höchsten Wert der beiden Negativkontrollen (Mock : TAS1R3 und TAS1R3 : Mock) wieder. mBU = milli-BRET units. Die Signifikanz zwischen den jeweiligen Rezeptorkombinationen und der Mock-Kontrolle mit den höheren Signalen (TAS1R3 : Mock) wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474]. Der BRET-Assay wurde von Julia Bauer (LSB) durchgeführt.

3.4.2 Zelloberflächenexpression des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 ist signifikant höher als die des Homodimers mGluR2 und vergleichbar mit der Oberflächenexpression von TAS1R3

Die relative Quantifizierung der Zelloberflächenexpression von mGluR2, TAS1R3 und dem gemeinsamen Heterodimer erfolgte mittels Durchflusszytometrie in vitalen HEK-293 Zellen [462]. Dazu wurden diese mit dem nicht-membrangängigen HaloTag® Alexa Fluor® 488 Liganden markiert, der den Anteil der Rezeptoren an der Zelloberfläche wiedergibt und somit ein Maß für die relative Zelloberflächenexpression darstellt.

Relativ zur Mock-Kontrolle (pfN21K) (schwarzer Balken Abb. 3.10) konnte für HT-mGluR2 die ~1,4-fache Menge, für HT-TAS1R3 die ~1,8-fache Menge an Protein an der Zelloberfläche nachgewiesen werden (blauer und grüner Balken Abb. 3.10), was einer signifikant höheren Proteinexpression im Vergleich zur Mock-Kontrolle entspricht. Um eine Vergleichbarkeit der Quantifizierung zwischen Homo- und Heterodimeren mittels HaloTag® zu gewährleisten, wurden zusätzlich zum jeweiligen Homodimer, das den HaloTag® trägt, der gleiche Anteil des Mock-Plasmids (ohne HaloTag®) transfiziert. Analog dazu besitzt im heterodimeren Konstrukt

ausschließlich der Rezeptor TAS1R3 das HaloTag®-Fusionsprotein (dunkelblauer Balken Abb. 3.10). Dabei konnte für mGluR2/HT-TAS1R3, ähnlich wie für das Homodimer HT-TAS1R3, eine signifikante höhere Zelloberflächenexpression um das ~ 1,8-fache gegenüber der mock-transfizierten Zellen detektiert werden. Zudem wies das Heterodimer eine signifikant höhere Expression als HT-mGluR2 auf.

Für das Heterodimer, in dem beide Rezeptoren den HaloTag® tragen (schraffierter dunkelblauer Balken Abb. 3.10) wurde im Vergleich zur Mock-Kontrolle eine ~2-fache Menge an Protein an der Zelloberfläche beobachtet, die mit der doppelten Menge an HaloTag® im Vergleich zum anderen Heterodimer-Konstrukt erklärt werden kann [474].

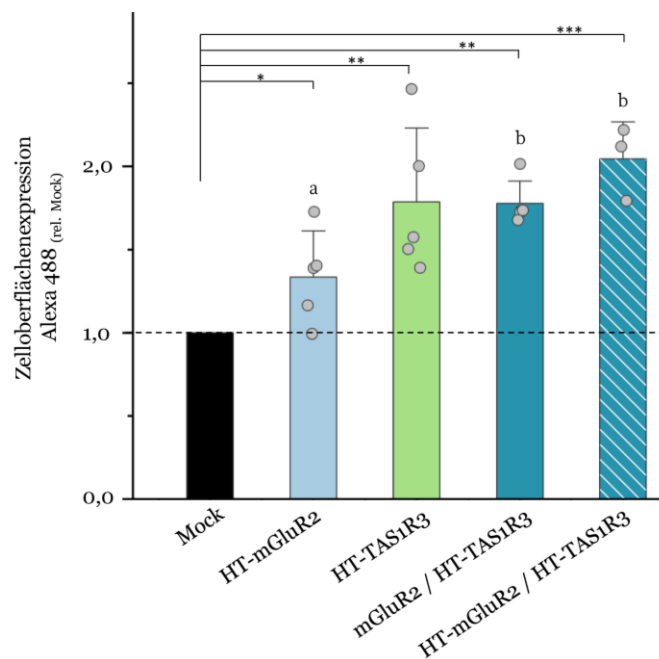


Abbildung 3.10: Relative Zelloberflächenexpressionslevel von mGluR2, TAS1R3 und dem Heterodimer mGluR2/TAS1R3. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3-5$ unabhängigen Experimenten. Die Normalisierung der Daten erfolgte auf die Anzahl positiver Zellen der Mock-Kontrolle nach Behandlung mit dem nicht-membrangängigen HaloTag® Alexa Fluor® 488 Liganden (gestrichelte Linie). Die Signifikanz zwischen der Mock-Kontrolle und den jeweiligen Rezeptordimeren wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt. (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede $p \leq 0,01$ zwischen HT-mGluR2 und mGluR2 / HT-TAS1R3 oder HT-mGluR2 / HT-TAS1R3. HT= HaloTag®. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

3.4.3 *Das humane Heterodimer mGluR2/TAS1R3 zeigt in der funktionellen Analyse signifikant geringere IC₅₀-Werte für MSG im Vergleich zu den Homodimeren auf*

Die Ergebnisse der Analyse von mGluR2 und TAS1R3 in Blutzellen und im heterologen Testzellsystem wiesen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eindeutig auf eine Heterodimerisierung dieser GPCRs hin. In einem nächsten Schritt wurde daher auf Grundlage dieser Befunde deren potentielle Funktionalität in HEK-293 Zellen [462] untersucht. Für die Detektion von Geruchsstoff-Rezeptor-Interaktionen hat sich der GloSensor™ cAMP Assay im rekombinanten Zellsystem als wichtige und sensitive Methode herausgestellt [464, 465]. Um die Funktionalität von mGluR2, TAS1R3 und dem gemeinsamen Heterodimer mGluR2/TAS1R3 in Bezug auf ihren gemeinsamen Agonisten Glutamat zu untersuchen, wurde diese Technologie im Rahmen der vorliegenden Arbeit herangezogen und so modifiziert, dass trotz G_{ai}-vermittelter Signaltransduktion verlässliche Konzentrations-Wirkungsbeziehungen ermittelt werden konnten (Abb. 2.1 und 2.4) [474]. Dazu wurden HEK-293 Zellen [462] mit den entsprechenden Rezeptoren, dem G_i-Protein sowie der genetisch modifizierten Luziferase (pGloSensor™-22F cAMP Plasmid) [464] transfiziert (s. 2.4.4) und mit Mononatriumglutamat im Konzentrationsbereich von 0,3 – 300 µmol/L zusammen mit 2,5 µmol/L Forskolin, dem Aktivator der Adenylatzyklase [468-470], stimuliert (Abb. 3.11). Die Analyse der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der MSG-aktivierten Verringerung der Forskolin-induzierten intrazellulären cAMP-Anhäufung [467] wurde für alle vier verschiedenen G_{ai}-Proteine (G_{ai1-3} und G_{αGustducin}) durchgeführt und die jeweiligen IC₅₀-Werte sowohl für die Homodimere mGluR2 und TAS1R3 als auch das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3 bestimmt (Tab. 3.4) [474].

Tabelle 3.4: IC₅₀-Werte von MSG für mGluR2, TAS1R3 und das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3 [474].

G-Protein	mGluR2	mGluR2/TAS1R3	TAS1R3
G _{αGustducin}	56.14 ± 10.12 ^b	25.66 ± 6.26 ^{B*}	k.A.
G _{ai1}	18.11 ± 2.91 ^b	5.88 ± 0.97 [*]	k.A.
G _{ai2}	19.88 ± 2.46 ^b	7.79 ± 0.52 ^{B*}	k.A.
G _{ai3}	8.38 ± 0.50 ^a	4.97 ± 0.59 ^{A*}	k.A.

Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von n=3-4 unabhängigen Experimenten in µmol/L. Signifikanz zwischen mGluR2 und mGluR2/TAS1R3 wurde mittels zweiseitigem t-Test bestimmt: (*) p ≤ 0,05. Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen G_{ai3} und den anderen getesteten G_i-Proteinen an (p ≤ 0,05).

Für alle getesteten G_{ai}-Proteine konnten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 signifikant niedrigere IC₅₀-Werte im Vergleich zu den entsprechenden Homodimeren mGluR2 und TAS1R3 ermittelt werden, wobei für letzteren Rezeptor mit keinem der verwendeten G_i-Proteine eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung erhalten werden konnte (Tab. 3.4 und Abb. 3.11 grüne Kurve). Mit den niedrigsten IC₅₀-Werten von 4,97 ± 0,59 µmol/L für mGluR2/TAS1R3 und 8,38 ± 0,5 µmol/L für mGluR2 stellte sich G_{ai3} als das potenteste G_{ai}-Protein heraus und

wurde aufgrund diesen Befundes für die nachfolgenden cAMP-Messungen herangezogen. Die ermittelten IC_{50} -Werte für den mGluR2-Rezeptor stimmen mit den Werten aus einer Studie von *Conn et al.* [129] überein, die für mGluR2 eine halbmaximale inhibitorische Glutamat-Konzentration von 4-20 $\mu\text{mol/L}$ konstatierte und bestätigen dadurch die Empfindlichkeit und Genauigkeit des im Rahmen dieser Arbeit modifizierten und etablierten cAMP-Lumineszenzassays.

Abbildung 3.11 veranschaulicht die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der jeweiligen Rezeptorkonstrukte mit $G_{\alpha_{i3}}$. Während die Kurven der Mock-Kontrolle (schwarz) und TAS1R3 (grün) einen Verlauf parallel zur x-Achse und somit keine Konzentrationsabhängigkeit aufzeigen, können für mGluR2 und mGluR2/TAS1R3 klare Rezeptorantworten auf MSG beobachtet werden. Dabei ist die Konzentrations-Wirkungskurve des Heterodimers (dunkelblaue Kurve) im Vergleich zum Homodimer mGluR2 (hellblaue Kurve) nach links verschoben. Durch Heterodimerisierung scheint sich ein potenteres Rezeptordimerkonstrukt gegenüber MSG zu bilden, was sich zusätzlich zum Kurvenverlauf in den, im Bereich der IC_{50} -Werte sogar signifikant, geringeren relativen RLU-Werten für das Heterodimer im Vergleich zum Homomer mGluR2 zeigte [474]. Um auszuschließen, dass andere Effekte oder Komponenten für den hier beschriebenen Befund verantwortlich sind, wurde darüber hinaus die Wirkung von Pertussis-Toxin (PTX) auf die transfizierten Zellen untersucht. PTX führt durch Ribosylierung des Adenosin-5'-Diphosphats (ADP) der $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit zu einer permanenten Aktivierung der Adenylatzyklase und der gleichzeitigen Hemmung der Interaktion von GPCR und G-Protein [473, 496]. Nach Behandlung der Zellen für 24 h mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ PTX konnte weder für das Homodimer mGluR2 noch für das Heterodimer eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung beobachtet werden (orangene Kurve), deren Kurve analog derer der Negativkontrolle (Mock-transfizierte Zellen (schwarze Kurve)), parallel zur X-Achse verlief. Dieser Befund bestätigte, dass die Ergebnisse des Lumineszenz-Assays auf die Funktionalität der jeweiligen transfizierten GPCRs zurückzuführen sind.

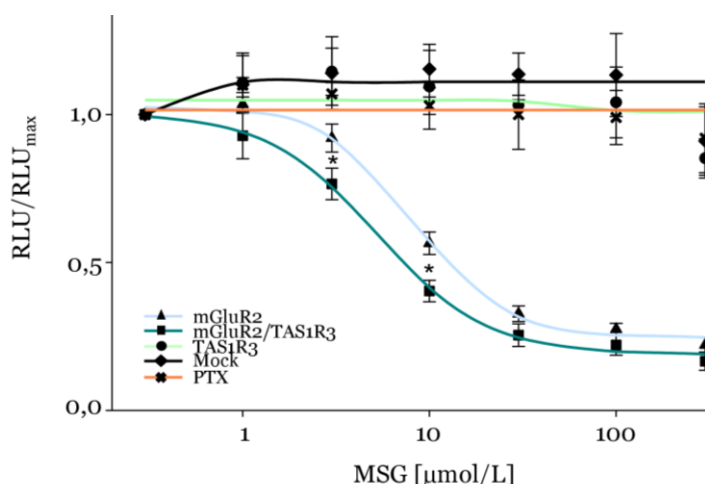


Abbildung 3.11: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für MSG in mGluR2, TAS1R3 bzw. mGluR2/TAS1R3 transfizierten HEK-293 Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Die Daten sind jeweils auf die geringste MSG-Konzentration normalisiert. Signifikanz zwischen mGluR2/TAS1R3 und mGluR2 wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt: (*) $p \leq 0,05$. RLU = Relative Luminescence Units. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

Die Konzentrations-Wirkungskurven in Abbildung 3.11 weisen in Reaktion auf Mononatriumglutamat einen signifikanten Heterodimer-bedingten Funktionsgewinn („gain-of-function“) auf. Um zu überprüfen, ob sich dieser Effekt auch in Kombination von mGluR2 mit den beiden anderen Mitgliedern der TAS1R-Familie, TAS1R1 bzw. TAS1R2, beobachten lässt, wurde der oben beschriebene Assay analog mit diesen beiden Rezeptoren durchgeführt und die entsprechenden IC_{50} -Werte bestimmt (Tab. 3.5). Für die jeweiligen Homomere TAS1R1 und TAS1R2 konnte wie schon für TAS1R3 keine Konzentrations-Wirkungsbeziehung beobachtet werden. Zudem zeigten die zusätzlich getesteten Heterodimer-Konstellationen keine signifikant unterschiedlichen halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen im Vergleich zu mGluR2 (mGluR2/TAS1R1: $10,62 \pm 1,26 \mu\text{M}$ und mGluR2/TAS1R2: $10,84 \pm 2,13 \mu\text{M}$). Dieser Befund lässt auf eine alleinige Funktion von mGluR2 in den jeweiligen Rezeptorkonstrukten schließen und unterstreicht die wichtige und einzigartige Bedeutung von TAS1R3, der zusammen mit mGluR2 ein potenteres und effizienteres Heterodimer-Konstrukt hinsichtlich MSG bildet [474].

Tabelle 3.5: IC_{50} -Werte von MSG für mGluR2 und dessen Kombination mit TAS1R1-TAS1R3 [474].

Rezeptoren	IC_{50} -Werte
mGluR2	8.38 ± 0.50^b
mGluR2/TAS1R3	$4.97 \pm 0.59^{a*}$
mGluR2/TAS1R2	10.84 ± 2.13^b
mGluR2/TAS1R1	10.62 ± 1.26^b

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3-4$ unabhängigen Experimenten in $\mu\text{mol/L}$. Signifikanz zwischen mGluR2 und mGluR2/TAS1Rs wurde mittels zweiseitigem t-Test bestimmt: (*) $p \leq 0,05$. Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen mGluR2/TAS1R3 und den anderen getesteten Homo- und Heterodimeren an ($p \leq 0,05$).

Basierend auf diesem Ergebnis stellte sich, auch in Hinblick auf eine Identifizierung möglicher spezifischer Agonisten für dieses Heterodimer, die Frage, ob sich dieses Rezeptorkonstrukt ausschließlich im menschlichen Körper wiederfindet oder ob die Bildung des Dimers auch in anderen Spezies erfolgen kann. Zur Beantwortung dieser Hypothese wurde die Maus als Beispielorganismus gewählt, deren Gene für *Grm2* und *Tas1r3* per Gensynthese in die entsprechenden Vektoren (pFN210A) kloniert und die Funktionsanalyse analog dem oben beschriebenen cAMP-Lumineszenzassays durchgeführt wurde (Abb. 3.12).

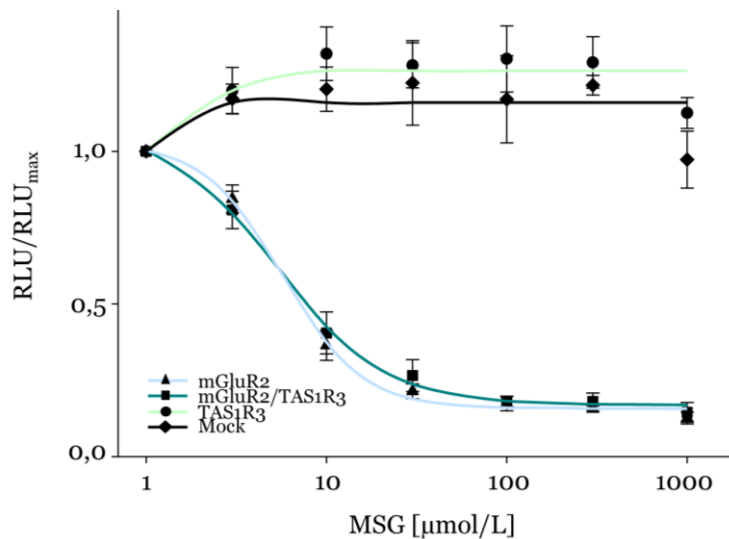


Abbildung 3.12: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für MSG in mGluR2 (murin), TAS1R3 (murin) bzw. mGluR2 (murin)/TAS1R3 (murin) transfizierten HEK-293 Zellen. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten in Triplikaten. Die Daten sind jeweils auf die geringste MSG-Konzentration normalisiert. RLU = Relative Luminescence Units.

Die Konzentrations-Wirkungskurven in Antwort auf MSG zeigten im Gegensatz zu den humanen GPCRs (Abb. 3.11) keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Homodimer mGluR2 (hellblaue Kurve) und dem Heterodimer mGluR2/TAS1R3 (dunkelblaue Kurve) auf. Beide Kurven verlaufen nahezu kongruent, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Effekt der dunkelblauen Kurve ausschließlich auf die Funktion des murinen mGluR2 in Antwort auf MSG zurückzuführen ist und TAS1R3 in diesem Konstrukt, anders als beim humanen Rezeptorkonstrukt, mit keinem Funktionsgewinn einhergeht. Analog zum humanen TAS1R3 konnte für den murinen Geschmacksrezeptor keine Konzentrations-Wirkungsbeziehung ermittelt werden (grüne Kurve). Dieser Befund spiegelt sich zusätzlich in den IC_{50} -Werten der murinen Rezeptoren (Tab. 3.6) wieder, die sich nicht signifikant unterschieden, sondern nahezu identisch ausfielen.

Tabelle 3.6: IC_{50} -Werte von MSG für die murinen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3

Rezeptoren	IC_{50} -Werte
mGluR2	$5,28 \pm 1,28$
mGluR2/TAS1R3	$5,76 \pm 0,89$
TAS1R3	k.A.

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten in $\mu\text{mol/L}$.

Zusammen mit den Ergebnissen der Genexpressions- und Proteinanalyse verstärken die Befunde der Experimente im rekombinanten Testzellsystem der HEK-293 Zellen die Stringenz der Heterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 im menschlichen Körper. Während die Anwesenheit beider Rezeptoren auf Genom- und Proteinebene bestätigt und deren Dimerisierung in Blutzellen mittels Co-IP nachgewiesen werden konnte, verdeutlichten die Co-Transfektionsexperimente zum einen die Bildung des Heteromers (BRET) und zeigten zudem einen daraus resultierenden Funktionsgewinn („gain-of-function“) in Antwort auf MSG, dem gemeinsamen Agonisten beider GPCRs, auf (cAMP-Lumineszenzassay). Zudem konnte unter Verwendung der murinen Orthologen ein Ausbleiben der Heterodimerisierung beobachtet werden, was auf eine spezifische Funktionalität des Rezeptorkonstrukts im menschlichen Körper hinweisen könnte. Um abschließend eine potentielle Funktion von mGluR2/TAS1R3 in Neutrophilen zu untersuchen, wurde im Anschluss mit Hilfe eines ELISAs dessen Funktionsanalyse durchgeführt.

3.5 Funktionsanalyse des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 in PMNs

3.5.1 Mononatriumglutamat erleichtert die fMLF-induzierte IL-8-Sekretion humaner PMNs *in vitro* via mGluR2/TAS1R3

Im menschlichen Blutsystem bilden Neutrophile die erste Verteidigungslinie des Immunsystems. Als spezifische Sensoren erkennen sie Entzündungsmediatoren, infolgedessen sie gezielt zu den entsprechenden Inflammationsherden im Körper wandern [497]. Die Aktivierung von PMNs erfolgt dabei durch chemotaktische Reize, wie beispielsweise des fMLFs (N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanin), eines aus Bakterien stammenden Tripeptids, welches nach Bindung an den FPR1-Rezeptors der Blutzellen zur Ausschüttung von Zytokinen, wie dem neutrophilen-stimulierenden Chemokin CXCL8 (IL-8), führt [243].

Die Stimulationsexperimente von PMNs mit MSG zeigten eine erhöhte MSG-vermittelte Genexpression von *GRM2* und *TAS1R3* (Abb. 3.6), deren gemeinsame Funktion im heterologen Zellsystem mittels cAMP Lumineszenzassay unter Beobachtung eines ‚*gain-of-function*‘ aufgezeigt werden konnte (Abb. 3.11). Um letztendlich eine Funktion dieses Rezeptordimers in den Blutzellen nachzuweisen, wurde mittels ELISA die fMLF-induzierte IL-8 Sekretion MSG-vorstimulierter PMNs untersucht und mit bzw. ohne Einsatz rezeptorspezifischer Antagonisten validiert. Analog zu den Genexpressionsanalysen wurde eine physiologische MSG-Konzentration von 50 µmol/L verwendet [493], der Konzentrationsbereich von fMLF lag zwischen 0,01 und 10 nmol/L (Abb. 3.13) [474].

Trotz nicht signifikant unterschiedlicher Konzentrations-Wirkungsbeziehungen zwischen behandelten und unbehandelten Zellen in Antwort auf fMLF (Abb. 3.13 A und EC₅₀-Werte s. Tab. A.5) wiesen die MSG-vorstimulierten Zellen (Abb. 3.13 A, blaue Kurve) einen signifikanten Anstieg der IL-8 Sekretion gegenüber den nicht stimulierten, mit RPMI-Medium (Abb. 3.13 A, grüne Kurve) bzw. den mit Antagonisten behandelten Zellen (Abb. 3.13 A, orange-braun farbige Kurven) auf. Dieser Effekt schien in den mit der höchsten Konzentration an fMLF (10 nmol/L) stimulierten Zellen am deutlichsten und am signifikantesten zu sein (Abb. 3.13 C). In diesen PMNs wurden IL-8-Konzentrationen von 113,95 ± 63,99 pg/ml beobachtet, während in den unbehandelten, RPMI-stimulierten Zellen lediglich IL-8-Level von 85,71 ± 46,39 pg/ml gemessen werden konnten. Für die jeweiligen, mit den entsprechenden Agonisten behandelten PMNs ergaben sich bei einer Stimulation von 10 nM fMLF IL-8-Konzentrationen von 56,15 ± 27,67 pg/ml (40 nM mGluR2 Antagonist 1), 58,14 ± 39,34 pg/ml (0,3 µM Lactisol) bzw. 61,61 ± 35,51 pg/ml (mGluR2 Antagonist 1 + Lactisol) (Abb. 3.13 B) [474].

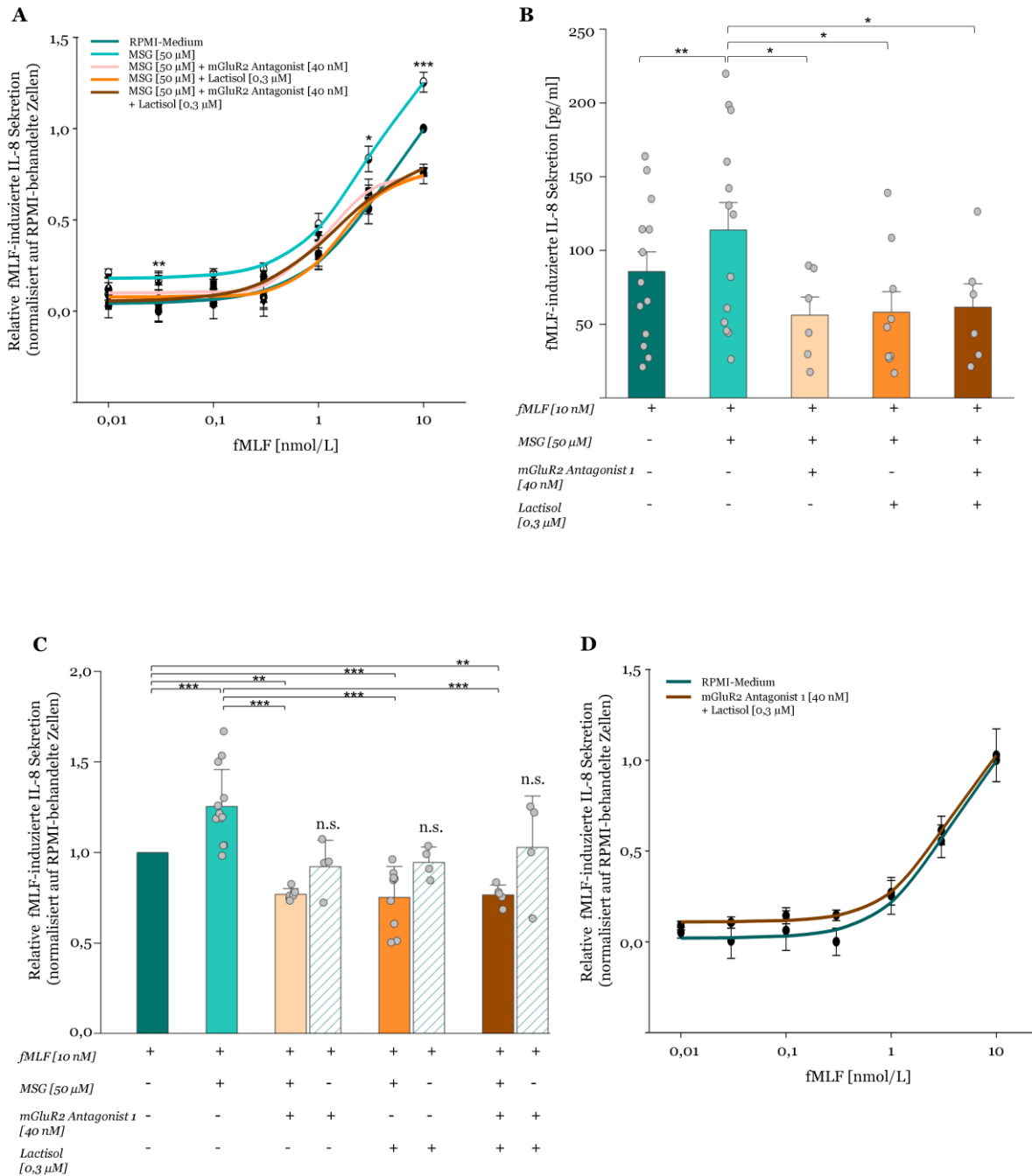


Abbildung 3.13: MSG erleichtert über das Heteromer mGluR2/TAS1R3 in vitro die fMLF-induzierte IL-8 Sekretion in isolierten PMNs. A: Vierstündige fMLF-induzierte IL-8 Sekretion nach zweistündiger Vorstimulation mit 50 µM MSG oder RPMI-Medium in An- bzw. Abwesenheit des mGluR2-spezifischen Antagonisten 1 und/oder des TAS1R3-spezifischen Antagonisten Lactisol. Veränderungen der IL-8 Konzentration wurden auf die in RPMI-Medium kultivierten Proben ohne MSG normalisiert (n = 6-13). Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM. Signifikanz zwischen unbehandelten und MSG-vorstimulierten Proben wurde mittels zweiseitigem t-Test ermittelt: (***) p ≤ 0,001; (**) p ≤ 0,01; (*) p ≤ 0,05. B: Maximale fMLF-induzierte IL-8 Konzentrationen in pg/ml in An- bzw. Abwesenheit des MSG-Vorstimulus oder der jeweiligen rezeptorspezifischen Antagonisten. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM (n=6-13), die Signifikanz wurde mittels einseitigem t-Test ermittelt: (**) p ≤ 0,01; (*) p ≤ 0,05. C: Veränderungen der fMLF-induzierten IL-8 Sekretion bei einer fMLF-Konzentration von 10 nM in An- bzw. Abwesenheit des MSG-Vorstimulus oder der

*jeweiligen rezeptorspezifischen Antagonisten. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n = 4-13$ unterschiedlichen Blutproben. Signifikanzen wurden mittels zweiseitigem t -Test ermittelt: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$. n.s.= nicht signifikant gegenüber RPMI-behandelten Zellen. D: Die jeweiligen Rezeptorantagonisten haben alleine keinen stimulierenden oder inhibierenden Effekt auf PMNs. Vierstündige fMLF-induzierte IL-8-Sekretion in isolierten PMNs in Abwesenheit von MSG, aber in Anwesenheit des mGlu2-spezifischen Antagonisten 1 und des TAS1R3-spezifischen Antagonisten Lactisol. Veränderungen der IL-8 Konzentration wurden auf die in RPMI-Medium kultivierten Proben normalisiert ($n = 4$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].*

Um mögliche, ggf. toxische Nebeneffekte der jeweiligen Antagonisten auf die Zellen auszuschließen, wurden diese zusätzlich zu den oben genannten Stimulationsansätzen mit den jeweiligen pharmakologischen Blockern gemeinsam mit der höchsten Konzentration an fMLF (10 nM) ohne MSG-Vorstimulation für 4 Stunden behandelt (schraffierte Balken Abb. 3.13 C und braune Kurve Abb. 3.13 D). Dabei konnten weder für den mGluR2 Antagonisten 1 noch für das Lactisol negative Effekte auf die Zellen beobachtet werden. Für keine der drei Bedingungen ließen sich signifikante Unterschiede zu den unbehandelten Zellen (grüner Balken Abb. 3.13) erkennen (n.s. = nicht signifikant), sodass die Abnahme der IL-8 Sekretion nach Antagonistenbehandlung in MSG-vorbehandelten Zellen vermutlich auf die Rezeptorhemmung von mGluR2 und/oder TAS1R3 und nicht auf inhibierende Effekte der eingesetzten Antagonisten zurückzuführen ist [474]. Interessanterweise bewirkte der alleinige Einsatz von Lactisol, dem TAS1R3-Liganden und Inhibitor des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3, eine vollständige Verschiebung der MSG-vermittelten, fMLF-induzierten Konzentrations-Wirkungsbeziehung der IL-8-Sekretion (Abb. 3.13 A, orangene Kurve) zurück auf ein ähnliches Niveau wie der, der RPMI-behandelten grünen Kurve (Abb. 3.13 A). Dieser Befund deutet darauf hin, dass ein potentiell mGluR2-Homodimer in den PMNs für die MSG-abhängige Wirkung der fMLF-induzierten IL-8-Sekretion unerheblich zu sein scheint. Analog dazu, führte die Verwendung des mGluR2 Antagonist 1 (rosa Kurve Abbildung 3.13 A) ebenso zu einer Kurvenverschiebung zurück auf das Niveau der RPMI-behandelten Zellen (grüne Kurve Abb. 3.13 A), was für eine Irrelevanz des Umami-Heterodimers TAS1R1/TAS1R3 in diesem Kontext spricht. Vielmehr deuten diese Ergebnisse, auch in Bezug auf die bereits erhobenen Daten auf Gen- und Proteinebene auf die Anwesenheit eines mGluR2/TAS1R3 Heterodimers hin, das allein für die verstärkte, MSG-abhängige, fMLF-induzierte IL-8-Sekretion in PMNs verantwortlich zu sein scheint.

In einem weiterführenden ELISA-Experiment mit gleichem Versuchsaufbau wurde zusätzlich zu den rezeptorspezifischen Antagonisten der mGluR2/mGluR3-spezifische Agonist LY379268 (20 nM) eingesetzt, der in nanomolaren Konzentrationen selektiv für mGluR2 zu sein scheint [498, 499]. Ähnlich wie MSG erleichterte der spezifische Agonist die fMLF-induzierte IL-8 Sekretion in isolierten PMNs signifikant (Abb. A.6, blauer Balken) – ein Effekt, der durch den mGluR2 Antagonisten 1 vollständig rückgängig gemacht werden konnte (Abb. A.6,

rosa Balken). In Zusammenhang mit den ELISA-Ergebnissen aus Abb. 3.13, deutet dieser Befund darauf hin, dass die erhöhte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion sowohl in Abhängigkeit von MSG als auch von LY379268 aus einer spezifischen Aktivierung des mGluR2-Rezeptors resultiert. Der Einsatz von Lactisol in einer Konzentration von 0,3 μM konnte die Wirkung des potenten Agonisten LY379268 nicht hemmen (Daten sind nicht gezeigt). Eine höhere Konzentration war aufgrund der stimulierenden Wirkung von Lactisol auf PMNs in Konzentrationen höher als 0,3 μM [222] nicht möglich.

3.5.2 MSG und der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 erhöhen intrazelluläres Ca^{2+} in isolierten PMNs

Intrazelluläre, kalziumabhängige Signalwege stellen für eine Vielzahl an Immunfunktionen einen wichtigen Mechanismus dar. Sie sind in Bezug auf Neutrophile an den meisten ihrer zellulären Immunantworten [500-502], wie beispielsweise ihrer Zellmotilität sowie ihrem Priming [255, 503] beteiligt. Das intrazelluläre Ca^{2+} in PMNs wird dabei in der Regel über die Aktivierung von GPCRs und anschließend über Ca^{2+} -Speicher- oder Liganden-gesteuerte Ca^{2+} -Kanäle moduliert. Vermittelt durch verschiedene Priming-Agenzien [228, 255, 503], kommt es folglich zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration aufgrund der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wie dem ER und/oder des Ca^{2+} -Einstroms über CRAC-Kanäle (*engl.* calcium release-activated Ca^{2+} channels) der Plasmamembran [500, 501, 504-507].

Die ELISA-Ergebnisse zeigten eine in Abhängigkeit von MSG bzw. LY379268 erhöhte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion, welche unter Verwendung der rezeptorspezifischen Antagonisten, mGluR2 Antagonist 1 und Lactisol, gehemmt werden konnte (Abb. 3.13 und A.6). Basierend auf dieser Erkenntnis wurde in einem weiterführenden Experiment eine mögliche Einflussnahme von MSG bzw. LY379268 auf die Ca^{2+} -Homöostase isolierter PMNs untersucht [474]. Unter Beibehaltung des zweistündigen Stimulationsansatzes (vgl. 3.4.1) erfolgte die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Agonisten in An- bzw. Abwesenheit des mGluR2 Antagonisten 1 und im Anschluss die Ermittlung der Ca^{2+} -Fluoreszenz in Fluo-4-beladenen PMNs mittels Durchflusszytometrie [228] (Abb. 3.14). Dabei konnte eine ähnliche und signifikant höhere Anzahl Fluo-4-positiver Zellen für MSG und LY379268 im Vergleich zu mGluR2 Antagonist 1 behandelten Zellen detektiert werden. Die Verwendung von Lactisol als spezifischer TAS1R3-Antagonist war in diesem Versuchsansatz aufgrund seiner bereits beschriebenen stimulierenden Eigenschaft bei bereits geringen Konzentration nicht möglich.

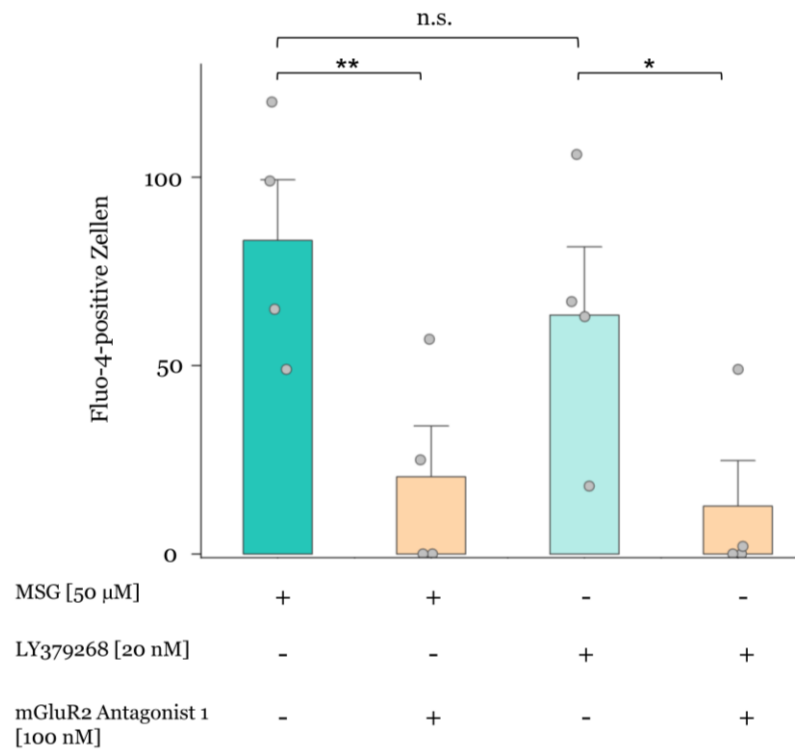


Abbildung 3.14: MSG und der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 erhöhen intrazelluläres Ca²⁺ in isolierten PMNs. Gezeigt sind die Anzahl an Fluo-4 positiven Zellen nach einer zweistündigen Inkubation mit MSG bzw. dem mGluR2-spezifischen Agonisten LY379268 in An- bzw. Abwesenheit des mGluR2 Antagonisten 1. Von jeder Messung wurde die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) abgezogen. Daten zeigen den Mittelwert ± SEM (n=4). Signifikanzen wurden mittels einseitigem t-Test ermittelt: (**) p ≤ 0,01; (*) p ≤ 0,05. n.s.= nicht signifikant. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474]. Die Durchflusszytometrie wurde von Corinna Kammermeier (LSB) durchgeführt und ausgewertet.

ZUSAMMENFASSUNG Die bisher dargestellten Ergebnisse umfassen eine detaillierte Analyse der Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3 sowohl in primären Blutzellen als auch im rekombinanten Zellsystem. Nicht nur auf genetischer Ebene konnten beide Rezeptoren innerhalb ihrer Klasse C GPCR-Familien in PMNs und T-Zellen als diejenigen mit den höchsten Transkriptniveaus identifiziert werden, deren Stimulation mit dem gemeinsamen Agonisten MSG sogar zu einer über 2-fach höheren Genexpression führte. Auf Proteinebene erfolgte darüber hinaus der Nachweis beider Rezeptoren mittels Western Blot und unter Verwendung der Immunzytochemie bzw. Co-IP sogar deren Co-Lokalisation und Heterodimerisierung. Die Expression der rekombinanten Rezeptoren in HEK-293 Zellen ermöglichte im Anschluss zum einen mit Hilfe des Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfers (BRET) die Validierung des Heteromers und lieferte zudem im PTX-sensitiven cAMP-Lumineszenzassay den Nachweis eines mGluR2/TAS1R3 abhängigen, MSG-induzierten Funktionengewinns. Nicht zuletzt bestätigte die Funktionsanalyse des Heterodimers in PMNs unter Zuhilfenahme rezeptorspezifischer Antagonisten, dass dieses Rezeptorkonstrukt für eine MSG-abhängige, fMLF-induzierte IL-8-Sekretion notwendig und ausreichend ist und lieferte somit einen zusätzlichen Beleg für die Heterodimerisierung von mGluR2 und TAS1R3 in humanen Blutzellen [474].

3.6 Identifizierung potentieller Agonisten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 im heterologen Zellsystem

Die oben beschriebenen Ergebnisse lieferten den Nachweis für eine Heterodimerisierung von mGluR2/TAS1R3 in humanen Blutleukozyten mit Hilfe von Glutamat als gemeinsamer Agonist. Jedoch stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage nach dem „eigentlichen“ Liganden dieses Rezeptorkonstrukts. Führt die Bildung des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 lediglich zu einem sensibleren, sensitiveren Rezeptordimer gegenüber MSG? Ist der einzige Grund für einen Zusammenschluss zweier unterschiedlicher Rezeptoreinheiten der Klasse C GPCRs die Bildung eines effizienteren Proteindimers oder gibt es möglicherweise einen oder mehrere Agonisten, spezifisch für das Heterodimer? Bekannt ist, dass der menschliche Körper jeden Tag rund 50 Gramm Glutamat eigenständig produziert [508], das von sensitiven Rezeptoren gebunden und im Anschluss dessen Signal weiter verarbeitet werden muss. Jedoch legen Studien nahe, dass aufgrund des hohen Metabolismus von über die Nahrung aufgenommenem MSG nur eine sehr geringe Menge im Blutkreislauf und somit in den Blutzellen ankommt [509-513]. Daher ist die Frage nach weiteren bzw. anderen Agonisten in diesem Kontext nicht unberechtigt. Der menschliche Organismus wird jeden Tag mit einer Vielfalt unterschiedlichster körpereigener und körperfremder Metabolite, Botenstoffe und weiterer zum Teil auch gefährlicher Substanzen konfrontiert. Es sind die Immunzellen, die die Funktion über die Entscheidung von „selbst“ und „nicht-selbst“ treffen. Die ektopische Expression von mGluR2/TAS1R3 auf Blutzellen des innaten und adaptiven Immunsystems legt die Vermutung nahe, dass dieses Rezeptorkonstrukt als Sensor für Lebensmittelinhaltsstoffe oder endo- bzw. exogen erzeugte Metaboliten bspw. bakterieller Herkunft dienen könnte, denen der Körper rund um die Uhr ausgesetzt ist. So lag er Fokus in Bezug auf die Ligandenidentifizierung im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit hauptsächlich auf dem Screening von potentiell immunologisch aktiven Substanzen, wie bakteriellen D-Aminosäuren und bakteriellen Überständen.

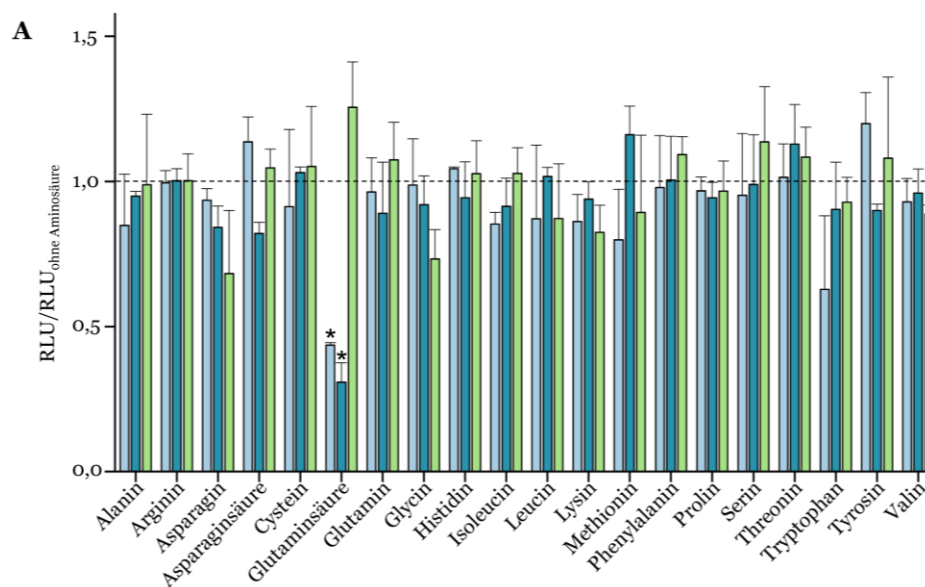
3.6.1 *L- und D-Aminosäuren reagieren mit Ausnahme der L-Glutaminsäure nicht auf das Heterodimer mGluR2/TAS1R3*

Ausgehend von der Aminosäure L-Glutamat, die einen gemeinsamen Agonisten von mGluR2, dem Umami-Rezeptor TAS1R1/TAS1R3 und, wie unter 4.3.3 identifiziert, dem Heterodimer mGluR2/TAS1R3 bildet, finden sich in der Literatur zahlreiche Studien über die Interaktion von L- und D-Aminosäuren mit dem Umami- bzw. Süßrezeptor und den metabotropen Glutamatrezeptoren [158, 160, 345, 514-522]. Heterologe Expressionsstudien im Jahre 2002 und 2006 zeigten die Fähigkeit des Umami-Rezeptors zur Bindung sowohl von L-Glutamat als auch der meisten L-Aminosäuren in Nagetieren auf [160], wobei für den gleichen Rezeptor im Menschen eine hohe Selektivität von L-Glutamat gegenüber den anderen L-Aminosäuren nachge-

wiesen wurde [158]. Nach *Frauli et al.* erfolgt die Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren ausschließlich über L-Glutamat [514].

Mit Ausnahme von Glycin, weisen alle 20 proteinogenen Aminosäuren eine Chiralität an ihrem α -Kohlenstoffatom auf und kommen neben der L-Form in der D-Form vor, die hauptsächlich mit Bakterien bzw. deren Zellwand und intrazellulären Signalen assoziiert ist [515]. Bereits 1969 konnten *Cline and Lehrer* [516] durch deren Entdeckung der D-Aminosäure-Oxidase (DAO) in humanen Neutrophilen einen Bezug zum Immunsystem darstellen, deren Funktion, der Oxidation von D-Aminosäuren unter Bildung von H_2O_2 , als bakterizides Enzym in Leukozyten identifiziert wurde [517-519]. Zusätzlich dazu wies die Studie von *Irukayama-Tomobe et al.* [520] die aromatischen D-Aminosäuren (D-Tryptophan und D-Phenylalanin) als Chemoattraktivitätsfaktoren für humane Leukozyten durch den GPCR GPR109B nach. Hinsichtlich des TAS1R3-Rezeptors konnten diese beiden D-Aminosäuren gemeinsam mit D-Leucin und D-Histidin sowohl in Bindungsstudien als auch in Immunzellen der oberen Atemwegen darüber hinaus als Aktivator für den Süßrezeptor (TAS1R2/TAS1R3) identifiziert werden [345, 521, 522].

Basierend auf diesen Studien, die einerseits eine Brücke zwischen mGluRs, TAS1R3 und dem Immunsystem schlagen und zudem deren Assoziation mit L- und D-Aminosäuren aufweisen, wurde im Folgenden mittels etabliertem cAMP-Lumineszenzassays ein Screening aller 20 proteinogenen Aminosäuren, sowohl in ihrer L-als auch D-Form durchgeführt, um potentielle Agonisten für das nachgewiesene Heterodimer zu identifizieren. Analog zu den oben genannten Stimulationsstudien wurde hierbei die gleiche Konzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ gewählt (Abb. 3.15).



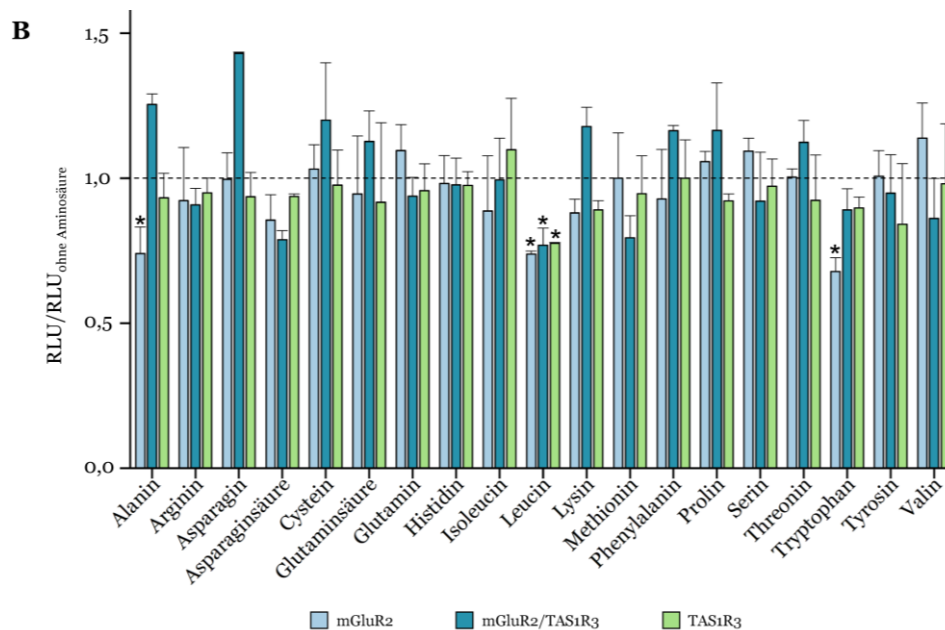


Abbildung 3.15: Screening aller 20 proteinogenen Aminosäuren in L- (A) und D-Form (B) gegen mGluR2, TAS1R3 und das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3 in einer Konzentration von 50 µmol/L. Gezeigt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von n=3 unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal ohne Aminosäure (Puffer) als Negativkontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau. Signifikanzen zwischen Negativkontrolle und jeweiliger Aminosäure erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (*) $p \leq 0,01$.

Das Screening der 20 proteinogenen L-Aminosäuren (Abb. 3.15 A) bestätigte die Studienergebnisse aus der Literatur [158, 160, 514]. Mit Ausnahme der Glutaminsäure, dessen Salz das Glutamat darstellt, konnte für keine der getesteten Substanzen eine Interaktion mit den jeweils getesteten Rezeptoren beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte das D-Aminosäure-Screening für D-Leucin und D-Tryptophan jeweils zu einer, in Bezug auf die Negativkontrolle, relativen Lumineszenzsignal-Reduktion von etwa 20 % (Abb. 3.15 B). Während für D-Tryptophan dieser Effekt ausschließlich für mGluR2 detektiert werden konnte, zeigte die Stimulation mit D-Leucin sowohl für die Homodimere mGluR2 und TAS1R3, als auch für das gemeinsame Heterodimer einen Abfall des cAMP-vermittelten Lumineszenzsignals. Das Ausbleiben signifikant geringerer relativer cAMP-Signale für mGluR2/TAS1R3 deutet jedoch nicht auf einen Heterodimer-bedingten, sondern vielmehr auf einen durch die einzelnen Homodimere ausgelösten Effekt gegenüber der D-Aminosäure hin.

Insgesamt führten die Aminosäure-Screenings zwar zur Identifizierung zweier, bisher nicht beschriebener, potentieller Agonisten für mGluR2 (D-Leucin und D-Tryptophan), die weiterer Charakterisierung bedürfen. Basierend auf der Fragestellung möglicher, spezifischer Agonisten für mGluR2/TAS1R3 im Rahmen der vorliegenden Arbeit, konnte jedoch keine signifikante Rezeptorinteraktion zwischen Heterodimer und Aminosäuren beobachtet werden.

3.6.2 Bestandteile im Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* weisen auf potentiellen Agonisten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 hin

In der Literatur sind zahlreiche Studien hinsichtlich der Assoziation von Geschmacksrezeptoren und dem Immunsystem beschrieben worden. Vielen gemein ist die Beteiligung von Mikroorganismen bzw. derer Metabolite an Immunreaktionen und Signaltransduktionen via chemosensorischer Rezeptoren [344, 345, 523-532]: Dabei wurde berichtet, dass vom oralen Mikrobiom stammende Metabolite und Toxine von Geschmacksrezeptoren detektiert werden können, die für die Bildung und Regulation der Immunantwort des Wirtes von hoher Bedeutung sind [523-525]. Darüber hinaus zeigten *Zhu et al.* [526] eine durch gastrointestinale Bakterien resultierende Manipulation der Expression des Süßrezeptors TAS1R2/TAS1R3. Auf den Immunzellen führt die Expression von Bitterrezeptoren zudem zur Erkennung bakterieller Moleküle, wie Quorum sensing Molekülen (QSMs) oder N-Acyl-Homoserin-Laktone (AHLs), die die Immunantwort des Wirtes durch Aktivierung von Chemotaxis der Immunzellen und der Sekretion antimikrobieller Peptide initiieren [344, 527-532]. Nicht zuletzt konnten *Lee et al.* einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Süßrezeptors durch bakterielle D-Aminosäuren und einer verminderten Immunantwort auf mikrobielle Bitterstoffe nachweisen [344, 345].

Auf Grundlage dieser Studien wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Klaus Neuhaus (ZIEL – Institut für Lebensmittel und Gesundheit, Technische Universität München) eine Auswahl von 14 unterschiedlichen Bakterienstämmen (Tabelle 3.7) getroffen. Diese wurden von Christine Fritsch (ZIEL) in MOD-Medium kultiviert und im Anschluss deren Überstände generiert. In Anlehnung an die Aminosäure-Screenings erfolgte mittels Lumineszenzassays [465, 474] deren Testung auf die jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und dem gemeinsamen Heterodimer (Abb. 3.16). Dabei konnten für 5 der getesteten bakteriellen Überstände signifikante Signal-Unterschiede im Vergleich zu den mit MOD-Medium stimulierten Rezeptoren beobachtet werden. Während die Überstände von *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides fragilis*, *Citrobacter freundii* und *Pseudomonas fluorescens* nur geringe relative Signalabfälle von maximal 20 % ergaben und häufig jeweils nur einer der untersuchten Rezeptoren, aber niemals das Heterodimer alleine, einen Effekt zeigte, konnte für den Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* eine deutliche Reduktion des Signals um ~50 % beobachtet werden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl für den mGluR2-Rezeptor, als auch für mGluR2/TAS1R3. Interessanterweise konnten für das Heterodimer sogar signifikant geringere Werte als für mGluR2 alleine detektiert werden, was für einen ähnlichen ‚*gain-of-function*‘ wie im Falle des MSG (s. 3.4.3) spricht. Bemerkenswert ist zudem, dass für *Pseudomonas fluorescens*, einem Bakterium aus der gleichen Gattung wie der *Pseudomonas aeruginosa* für das Heterodimer keine relativen Signalabfälle beobachtet werden konnten, sodass es sich hierbei um eine oder mehrere,

für den *Pseudomonas aeruginosa* spezifische Substanz(en) handeln muss, die für die Reduktion des Lumineszenzsignals verantwortlich sind.

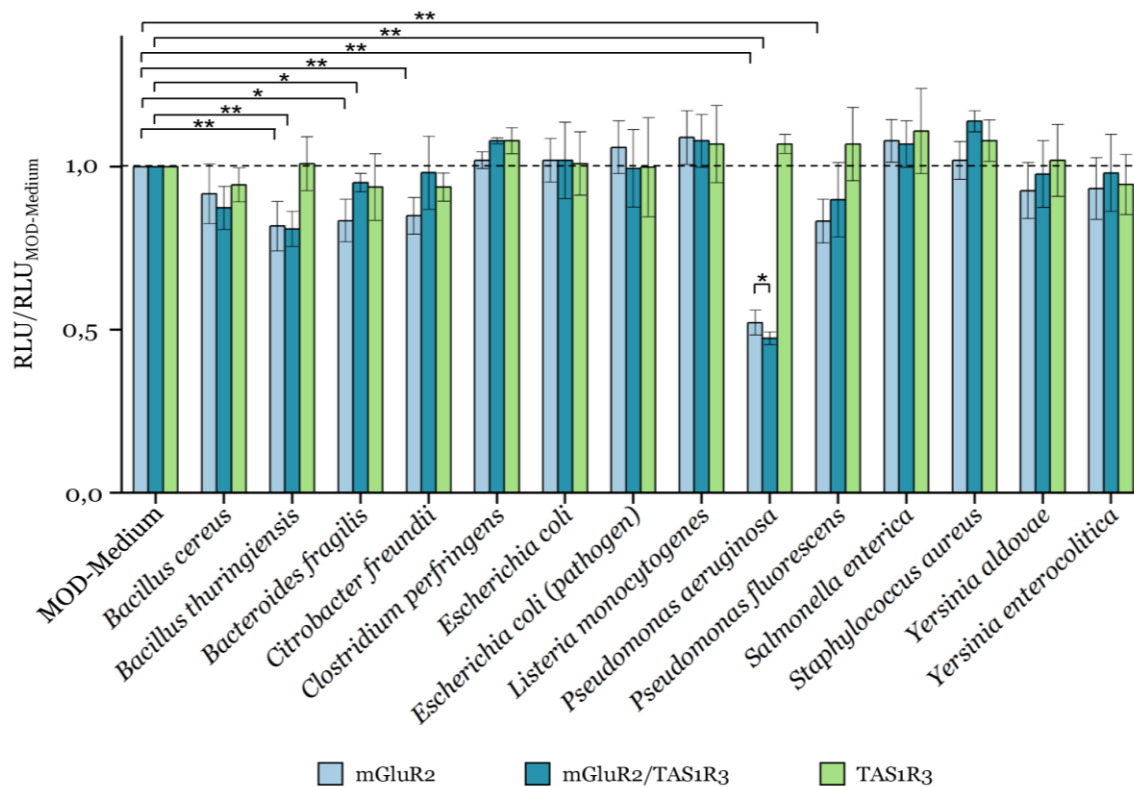


Abbildung 3.16: Screening von 14 bakteriellen Überständen gegen mGluR2, TAS1R3 und das gemeinsame Heterodimer mGluR2/TAS1R3. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal des MOD-Mediums als Negativkontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau an. Signifikanzen zwischen Negativkontrolle und jeweiligem Überstand erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$.

Tabelle 3.7: Bakterienstämme mit ihren jeweiligen Identifizierungsnummern, verwendet für das Überstandsscreening mit mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3

Bakterienstamm	Identifizierungsnummer
<i>Bacillus cereus</i>	WSBC 10530
<i>Bacillus thuringiensis</i>	WS 2632
<i>Bacteroides fragilis</i>	WS 3513
<i>Citrobacter freundii</i>	G 165
<i>Clostridium perfringens</i>	WS 2952
<i>Escherichia coli</i>	WS 1323
<i>Escherichia coli (pathogen)</i>	WS 4438
<i>Listeria monocytogenes</i>	WS 2301
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WS 5293
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WS 1760
<i>Salmonella enterica</i>	WS 4637
<i>Staphylococcus aureus</i>	WS 2438
<i>Yersinia aldovae</i>	WS 3488
<i>Yersinia enterocolitica</i>	WS 3760

Die in Abbildung 3.16 und Tabelle 3.7 aufgeführten bakteriellen Überstände stellten ein erstes Screening zur Identifizierung potentieller Agonisten für mGluR2/TAS1R3 dar, beinhalteten jedoch keine aufeinander abgestimmten Parameter, wie bspw. übereinstimmende OD₆₀₀-Werte, die für einheitliche Zelldichten bzw. Wachstumskinetiken sprechen und somit eine Vergleichbarkeit der einzelnen relativen Überstandssignale ermöglichen würden. Aufgrund der immensen Unterschiede im Verhalten der bakteriellen Überstände von *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* auf die Rezeptordimere mGluR2 und mGluR2/TAS1R3, trotz Zugehörigkeit zu derselben Gattung, der Pseudomonaden, wurden beiden Stämme erneut kultiviert und bei einer OD₆₀₀ von jeweils 0,4 deren Überstände gewonnen. Der anschließend durchgeführte cAMP-Lumineszenzassay im rekombinanten Testzellsystem [465, 474] lieferte zum bakteriellen Überstandsscreening (Abb. 3.16) analoge Ergebnisse (Abb. 3.17). Während für *P. fluorescens* kein Abfall des cAMP-Signals beobachtet werden konnte, lieferte die Stimulation der Rezeptoren mGluR2 und mGluR2/TAS1R3 mit *P. aeruginosa* einen zum MOD-Medium relativen und signifikanten Signalabfall von 50-60 %. Erneut wurden für das Heterodimer geringere Signale als für mGluR2 gemessen, während TAS1R3 keine Reaktion auf *P. aeruginosa* zeigte.

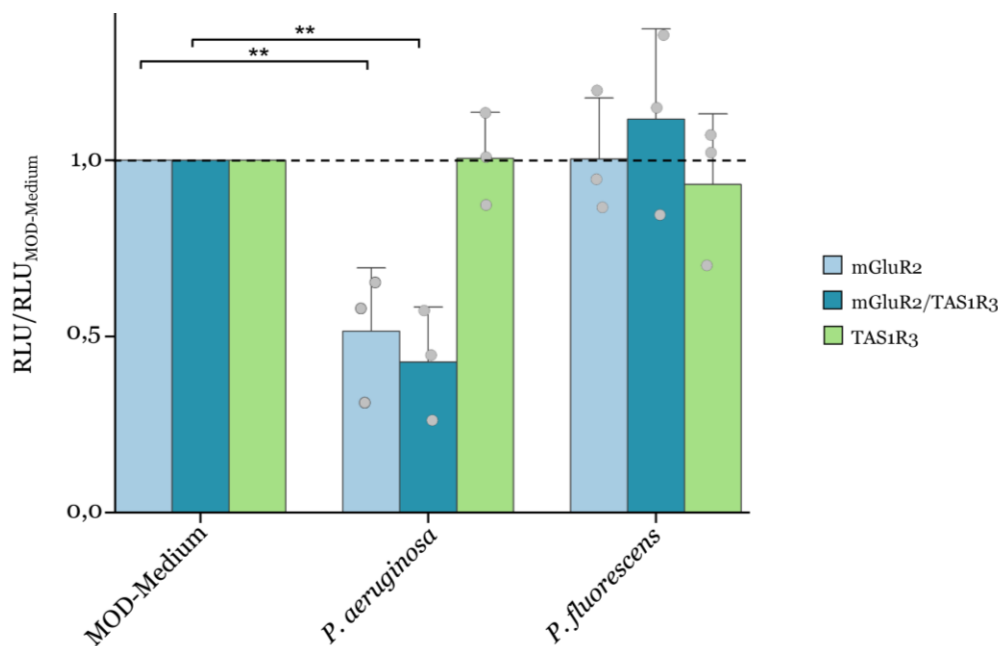


Abbildung 3.17: Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit *P. aeruginosa* und *P. fluorescens* der gleichen OD ($OD_{600} = 0,4$). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal des MOD-Mediums als Negativkontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau an. Signifikanzen zwischen Negativkontrolle und jeweiligem Überstand erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (**) $p \leq 0,01$.

Dieser Befund liefert einen eindeutigen Beleg für einen spezie-spezifischen Effekt von aus *P. aeruginosa* stammenden Metaboliten oder Toxinen auf die Rezeptoren mGluR2 und mGluR2/TAS1R3. Beide untersuchten Pseudomonaden wurden im gleichen Medium kultiviert

und deren Überstand bei einer Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von jeweils 0,4 generiert, sodass sich im Überstand lediglich Substanzen spezifisch für die jeweiligen Mikroorganismen bei gleicher Wachstumsphase und –bedingungen wiederfinden.

Für die Identifizierung des oder der für diese spezie-spezifische Eigenschaft verantwortlichen Substanz(en), erfolgte in einem ersten Schritt deren Charakterisierung hinsichtlich Größe und Polarität, um die Wahl einer entsprechenden Methode für die weiterführende Analyse des Überstandes zu erleichtern (Abb. 3.18 und 3.19).

Unter Verwendung einer Zentrifugaleinheit mit einem ‚Molecular Weight Cut-Off‘ (MWCO) von 1 kD (Kilodalton), einer Molekulargewichtsgrenze, die bei Filtration die Trennschärfe bzw. das Rückhaltevermögen von Membranen wiedergibt, wurden der Überstand von *P. aeruginosa* sowie das MOD-Medium filtriert. Der gesammelte Durchfluss, der nur noch Substanzen kleiner 1kD enthielt, wurde im Anschluss mittels cAMP-Lumineszenzassay [465, 474] gemessen und die Werte auf das gefilterte MOD-Medium normalisiert (Abb. 3.18).

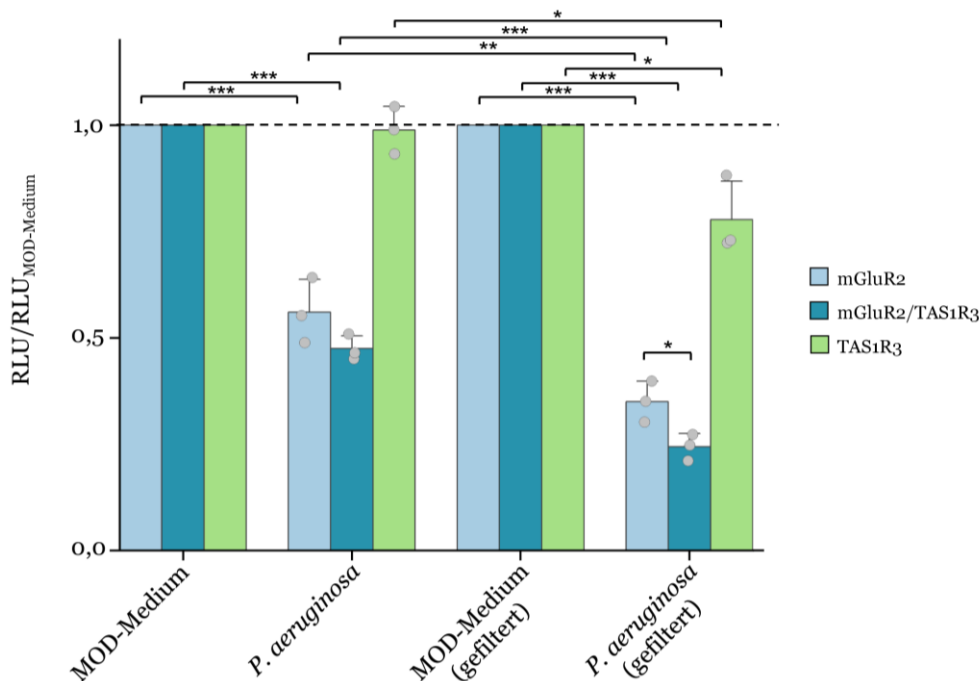


Abbildung 3.18: Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit ungefiltertem und gefiltertem *P. aeruginosa*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal des MOD-Mediums als Negativkontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau an. Signifikanzen zwischen Negativkontrolle und jeweiligem Überstand erfolgte mittels zweiseitigem t-Test: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$.

Interessanterweise konnten hierbei im Vergleich zum ungefilterten Überstand sowohl für mGluR2 als auch für mGluR2/TAS1R3 signifikant geringere Lumineszenzsignale für die filtrierte Substanz erhalten werden, deren Intensitäten für mGluR2 bei etwa 35 % und für das Heterodimer bei etwa 25 % gegenüber dem gefilterten MOD-Medium lagen. Erneut zeigte

mGluR2/TAS1R3 signifikant geringere Signale als das Homodimer. Anders als die ungefilterte Probe führte der filtrierte Überstand von *P. aeruginosa* darüber hinaus für TAS1R3 zu einer relativen Signalreduktion von etwa 23 % und somit einem zum MOD-Medium signifikanten Abfall der Lumineszenz. Möglicherweise führte die Filtration zu einer Aufkonzentration der im Überstand enthaltenen Substanzen, die für die geringeren relativen Lumineszenzsignale verantwortlich sein könnten. Dabei scheint *P. aeruginosa* eine oder mehrere Substanzen zu enthalten bzw. zu produzieren, die stimulierend auf alle drei Rezeptoren, mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 zu wirken scheinen.

Basierend auf ihrer Volatilität können Substanzen in zwei Kategorien, den nichtflüchtigen und den flüchtigen Stoffen eingeteilt werden. Aufgrund ihrer schwächeren intermolekularen Kräfte gehen letztere bereits bei Raumtemperatur leicht in die Gasphase über und können mittels Rotationsverdampfer oder Vakuumkonzentratoren somit von nichtflüchtigen Substanzen getrennt werden. Diese Fähigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit genutzt, um Aufschluss über die Flüchtigkeit des oder der rezeptorstimulierenden Substanz(en) zu erhalten und basierend auf diesem Resultat die Wahl einer geeigneten chemisch-analytischen Methode, der Gas- oder Flüssigchromatographie, zur Identifizierung des oder der entsprechenden Agonisten treffen zu können. Dazu wurden die gefilterten Proben, der Gesamtüberstand von *P. aeruginosa* sowie das MOD-Medium, in einen SpeedVac-Vakuumkonzentrator getrocknet und mit ddH₂O im gleichen Volumen wie dem Ausgangsvolumen aufgenommen, um konstante und vergleichbare Konzentrationen der entsprechenden Substanzen zu gewährleisten. Die Analyse der Proben erfolgte im Anschluss mittels cAMP-Lumineszenzassay [465, 474] (Abb. 3.19).

Hierbei zeigte sich ein analoges Bild zwischen den gefilterten und den zusätzlich getrockneten und resuspendierten Überständen von *P. aeruginosa*. Für beide Proben konnten in etwa die gleichen relativen Lumineszenzsignale beobachtet werden. Obwohl der Signalabfall für das Heterodimer bei Stimulation mit dem getrockneten Überstand signifikant geringer ausfiel, blieben für beide Proben die signifikanten Unterschiede zwischen Homo- und Heterodimer erhalten, sodass es sich bei der oder den mit den Rezeptoren interagierende(n) Substanzen(en) eindeutig um nichtflüchtige Verbindung(en) handeln muss.

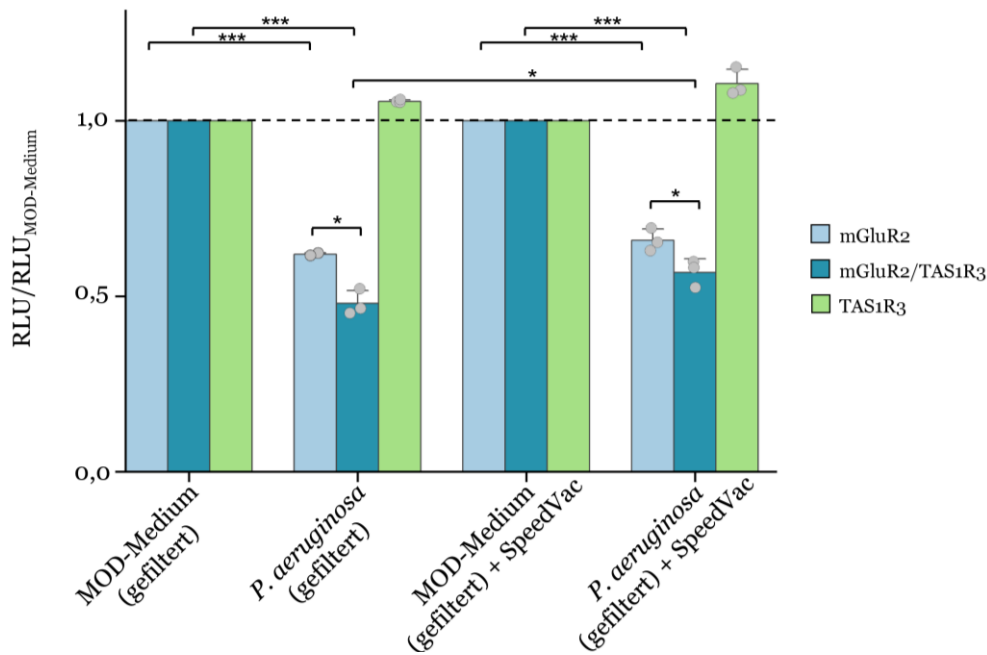


Abbildung 3.19: Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit gefiltertem bzw. gefilterten und zusätzlich mittels SpeedVac getrocknetem *P. aeruginosa*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal des MOD-Mediums als Negativkontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau an. Signifikanzen zwischen Negativkontrolle und jeweiligem Überstand erfolgte mittels zweiseitigem *t*-Test: (***) $p \leq 0,001$; (*) $p \leq 0,05$.

Im Zuge der Verwendung des SpeedVac-Vakuumkonzentrators wurden zusätzlich Löslichkeitsstudien durchgeführt. Dazu wurde der getrocknete Überstand in verschiedenen Lösungsmitteln mit aufsteigender Polarität resuspendiert (Acetonitril < Isopropanol < Ethanol < Methanol < Wasser). Dabei zeigte sich, dass eine Löslichkeit des Überstands ausschließlich im polarsten Lösungsmittel, dem Wasser, gegeben war und es sich folglich um eine sehr polare Mischung handeln muss.

Die Analyse des bakteriellen Überstandes von *P. aeruginosa* lieferte erste Erkenntnisse in Bezug auf Eigenschaften des oder der zu identifizierenden Substanz(en). Unter Zuhilfenahme einer Zentrifugaleinheit mit einem MWCO von 1 kD konnte eine entsprechende Eingrenzung bzw. Aufkonzentrierung der im Überstand enthaltenen und relevanten Verbindung(en) erreicht werden, die sich darüber hinaus durch nichtflüchtige und sehr polare Attribute auszeichnen. Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte im Anschluss eine Fraktionierung des Überstandes mittels HPLC (s. 3.6.4) und parallel dazu eine Testung von in der Literatur beschriebenen, spezifischen Komponenten im Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* mittels cAMP-Lumineszenzassay im rekombinanten Testzellensystem [465, 474] (s. 3.6.3).

3.6.3 *Bekannte Komponenten aus dem Überstand von Pseudomonas aeruginosa zeigen keine Reaktion gegenüber mGluR2/TAS1R3, interagieren jedoch teilweise mit dem TAS1R3-Rezeptor*

Pseudomonas aeruginosa ist ein Mikroorganismus mit zahlreichen Signalsystemen, die ihm eine hohe Anpassungsfähigkeit und rasche Besiedlung unterschiedlicher Umgebungen ermöglichen und mit deren Hilfe dessen Virulenz durch massive Genexpressionsveränderungen reguliert wird [533]. In der Literatur finden sich zahlreiche Studien, die sich intensiv mit den Signalwegen und entsprechenden Substanzen beschäftigen, auf deren Grundlage im Zuge dieser Arbeit die für *P. aeruginosa* wichtigsten Signalmoleküle ausgewählt und für die Stimulation der Rezeptoren im rekombinanten Testzellsystem herangezogen wurden.

Im Jahre 1999 analysierten *Holden et al.* [534] den bakteriellen Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* mittels Massenspektrometrie und NMR und identifizierten sowohl 2 AHLs (N-Acyl-Homoserinlaktone), das *N*-3-oxo-Dodekanoyl-Homoserinlaktin (3-Oxo-C₁₂-HSL) sowie das *N*-Butanoyl-Homoserinlaktin, als auch zwei DKPs (Diketopiperazine), das Cyclo(Δ -Ala-L-Val) sowie das Cyclo(L-Pro-L-Tyr) (Maculosin), bei denen es sich um bekannte Quorum-Sensing Moleküle handelt. Im gleichen Jahr konnten *Pesci et al.* [535] die Bedeutung des Signalmoleküls PQS (*Pseudomonas* Quinolone Signal) für die Zell-Zell-Kommunikation identifizieren, dessen Funktion ähnlich dem seines Vorgängermoleküls, dem HHQ (2-Heptyl-4(1H)-Quinolone), zu sein scheint [536]. Ausschließlich von *P. aeruginosa* produziert, stellt das Phenazin Pyocyanin (5-N-Methyl-1-Hydroxyphenazin) einen der Hauptvirulenzfaktoren des Bakteriums dar, der zu akuten und chronischen Infektionen beiträgt [537]. Nicht zuletzt scheinen diffusionsfähige Signalfaktoren (DSF) einen wichtigen Beitrag bei der bakteriellen Kommunikation zwischen verschiedenen Spezies zu spielen [533]. Im Falle von *Pseudomonas aeruginosa* konnte die *cis*-2-Dezensäure aus dessen Überstand isoliert werden, die aufgrund der Beeinflussung der Biofilmbildung dieses Bakteriums sowie deren Eigenschaft der Dispersions etablierter *P. aeruginosa* Biofilme und Biofilme einer großen Breite anderer Spezies einen wichtigen DSF darstellt [533, 538].

Die Stimulation der Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und dem gemeinsamen Heterodimer im rekombinanten Testzellsystem [465, 474] mit den mittels Literaturangaben ermittelten, wichtigsten Signalmolekülen von *Pseudomonas aeruginosa*, erfolgte im Konzentrationsbereich von 0,8 – 200 $\mu\text{mol/L}$ (Tab. 3.8; Abb. 3.17). Während für keine der Substanzen eine Konzentrationsabhängigkeit in Bezug auf mGluR2 beobachtet wurde, konnten für zwei der getesteten Verbindungen sowohl für das Heterodimer als auch für TAS1R3 eine Konzentrationsabhängigkeit detektiert und infolgedessen die korrespondierenden IC₅₀-Werte ermittelt werden (Tab. 3.8). Dabei ergaben sich für PQS Werte von $19,32 \pm 2,48 \mu\text{mol/L}$ für das Heterodimer bzw. $17,88 \pm 1,34 \mu\text{mol/L}$ für TAS1R3; für *cis*-2-Dezensäure konnten Werte von $22,35 \pm 3,17 \mu\text{mol/L}$

für mGluR2/TAS1R3 und $19,00 \pm 3,24$ für TAS1R3 ermittelt werden. Aufgrund der nicht signifikant unterschiedlichen IC_{50} -Werte (Tab. 3.8) sowie einem nahezu identischen Kurvenverlauf für das Heterodimer und TAS1R3 (Abb. 3.20) ist jedoch davon auszugehen, dass der beobachtete, konzentrationsabhängige Effekt des Heterodimers ausschließlich auf die Funktion von TAS1R3 zurückzuführen ist, und es sich folglich in beiden Fällen um keinen Agonisten spezifisch für mGluR2/TAS1R3 handelt. Bemerkenswert hierbei ist jedoch, dass TAS1R3 scheinbar alleine eine Rezeptorantwort auf zwei unterschiedliche Substanzen zu geben scheint, die als mögliche, bisher unbekannte Agonisten auf diesen Rezeptor zu wirken scheinen und derer Interaktionen es weiterer Untersuchungen bedarf. In Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Fragestellung über mögliche, spezifische Agonisten für mGluR2/TAS1R3 führte die Rezeptorstimulation mit bekannten, charakteristischen Signalmolekülen von *Pseudomonas aeruginosa* jedoch nicht zu einem positiven Ergebnis, weshalb in einem nächsten Schritt die Analyse des filtrierten Überstandes mittels HPLC erfolgte (s. 3.6.4).

Tabelle 3.8: IC_{50} -Werte wichtiger Signalmoleküle von *Pseudomonas aeruginosa* für mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3

Substanz	mGluR2	mGluR2/TAS1R3	TAS1R3
3-Oxo-C12-HSL [534]	k.A.	k.A.	k.A.
C4-HSL [534]	k.A.	k.A.	k.A.
cis-2-Dezensäure [538]	k.A.	$22,35 \pm 3,17$	$19,00 \pm 3,24$
Cyclo(Δ -Ala-L-Val) [534]	k.A.	k.A.	k.A.
Maculosin (Cyclo(L-Pro-L-Tyr)) [534]	k.A.	k.A.	k.A.
HHQ (2-Heptyl-4(1H)-Quinolon) [536]	k.A.	k.A.	k.A.
PQS (Pseudomonas Quinolon Signal) [535]	k.A.	$19,32 \pm 2,48$	$17,88 \pm 1,34$
Pyocyanin [537]	k.A.	k.A.	k.A.

Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten in $\mu\text{mol/L}$.

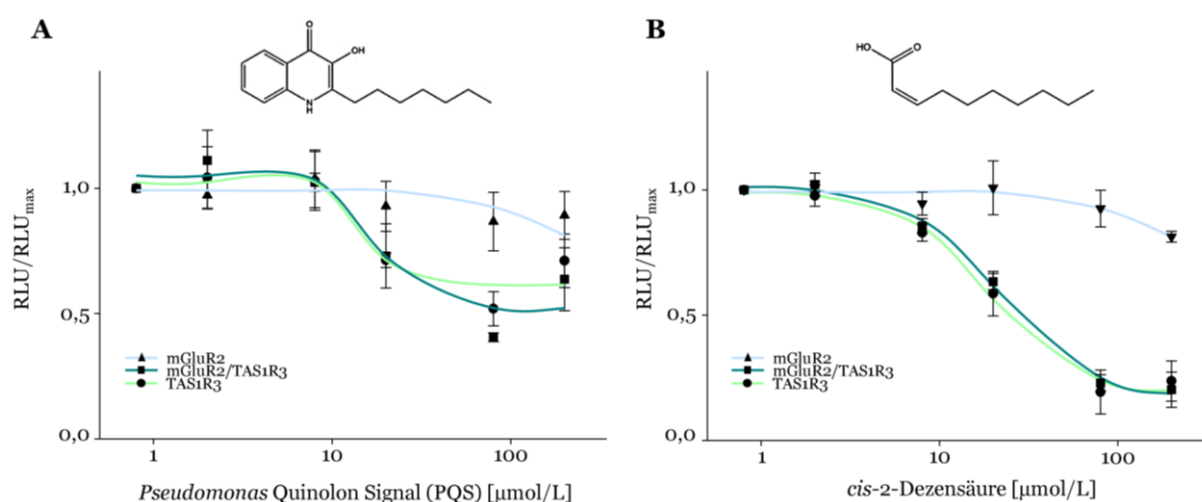


Abbildung 3.20: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für PQS (A) und cis-2-Dezensäure (B) in mGluR2, TAS1R3 bzw. mGluR2/TAS1R3 transfizierten HEK-293 Zellen mit ihren Strukturformeln. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten in Triplikaten nach abzogener Mock-Kontrolle. Die Daten sind jeweils auf die geringste Konzentration der jeweiligen Substanz normalisiert. RLU = Relative Luminescence Units.

3.6.4 Fraktionierung des Überstandes von *Pseudomonas aeruginosa* mittels HPLC ergab Fraktionen mit signifikanter Rezeptorinteraktion im rekombinanten Testzellsystem

Die Fraktionierung des Überstandes von *Pseudomonas aeruginosa* erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Oliver Frank und Frau Verena Schlagbauer vom Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und Molekulare Sensorik an der Technischen Universität München. Um einen Überblick über die Komplexität der Zusammensetzung dieses Substanzgemisches zu erhalten, wurde zunächst eine Vorfraktionierung des Überstandes in 20 Einzelfraktionen durchgeführt, im Anschluss gefriergetrocknet und in ddH₂O aufgenommen, dessen Volumen der gleichen Menge wie der des fraktionierten Überstandes entsprach. Analog zu den Aminosäure-Screenings erfolgte daraufhin die Messung der jeweiligen Fraktionen mit Hilfe des cAMP-Lumineszenzassays im rekombinanten Testzellsystem [465, 474], deren Signale jeweils auf die des Lumineszenzpuffers normalisiert wurden (Abb. 3.21).

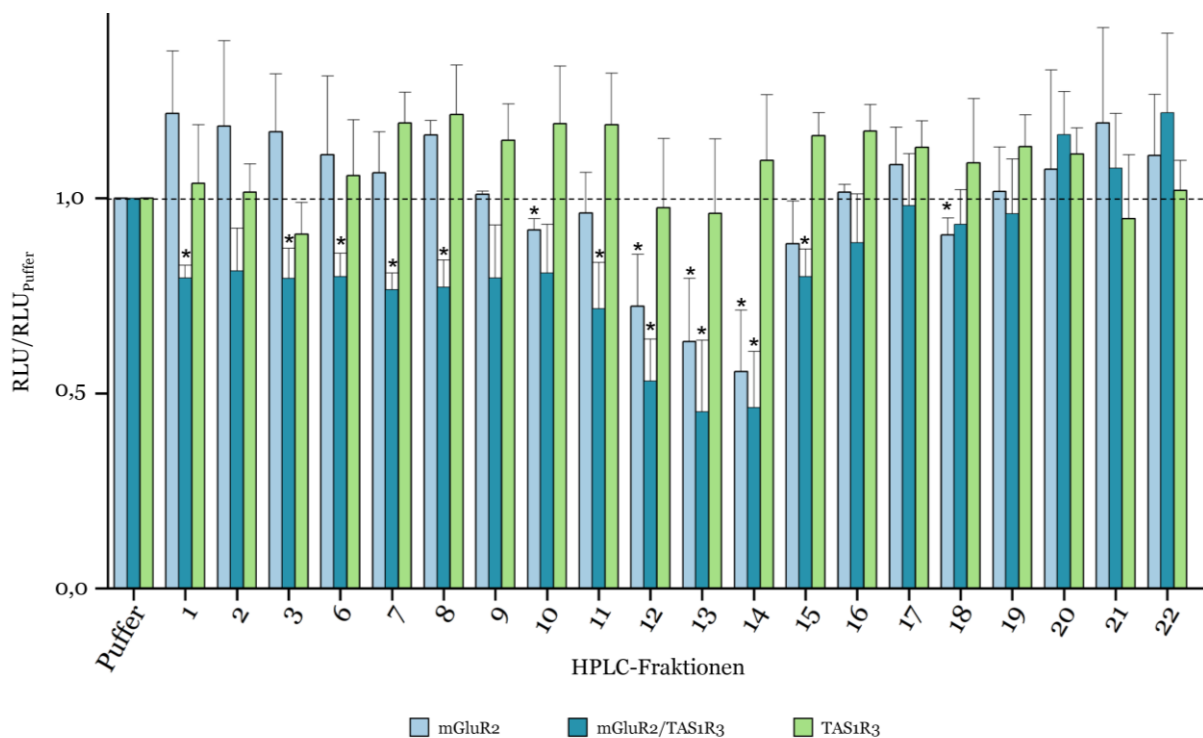


Abbildung 3.21: Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit einzelnen HPLC-Fractionen des gefilterten *P. aeruginosa*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal des Messpuffers als Negativkontrolle normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau an. Signifikanzen zwischen Negativkontrolle und der jeweiligen Fraktion erfolgte mittels zweiseitigem t-Test: (*) $p \leq 0,05$. Als HPLC-Säule fungierte die Luna HILIC, 250 x 21,2 mm, 5 μ m (Phenomenex Inc., Torrance, USA) mit den Fließmitteln 0,1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril (B) in einem Gradienten von 95 % B, der sich in 25 min auf 60 % B reduzierte und in 2 min bei einem Fluss von 20 ml/min zurück auf 95 % B führte.

Die Ergebnisse der Lumineszenzmessungen ergaben ein klares Bild über das Elutionsverhalten des oder der im Rahmen dieser Arbeit relevanten Substanz(en). Obwohl bereits in den ersten Fraktionen interessanterweise ausschließlich für das Heterodimer signifikante relative Signalabfälle von etwa 20 % beobachtet werden konnten, führten die Fraktionen 12-14 zu einem, sowohl für mGluR2 als auch mGluR2/TAS1R3 deutlichen, gegenüber der Puffer-Kontrolle signifikanten, Abfall der Lumineszenz um bis zu 50 %. Dabei lieferte analog zu den bereits beobachteten Signalen für den Überstand von *P. aeruginosa* das Heterodimer geringere relative Lumineszenzsignale als das Homodimer mGluR2. Die im weiteren Verlauf der HPLC eluierten Fraktionen ergaben hingegen deutlich geringere bzw. am Ende des HPLC-Laufes keine relativen Signalabfälle gegenüber der Pufferkontrolle. Für TAS1R3 konnte für keine der Fraktionen eine Rezeptorinteraktion in Form einer Signalreduktion detektiert werden.

Angesichts der ähnlichen relativen Lumineszenzsignalintensitäten, ausgelöst durch die aufeinanderfolgenden Fraktionen 12-14, ist davon auszugehen, dass aufgrund der für die grobe Vorfraktionierung gewählten HPLC-Parameter, wie Säule, Lösungsmittelgradient und Laufgeschwindigkeiten eine nicht vollständige Trennung der einzelnen Analyten im Überstand erfolgte und sich infolgedessen eine Elution der relevante(n) Substanz(en) über drei Fraktionen (12-14) hinweg ergab. Jedoch lieferte die HPLC durch Auftrennung des *P. aeruginosa*-Überstandes einen weiteren wesentlichen Schritt hinsichtlich deren Identifizierung, da ein Großteil der Bestandteile im Überstand als Agonisten für mGluR2/TAS1R3 bereits ausgeschlossen werden und sich die folgenden Analysen lediglich auf einen Bruchteil der enthaltenen Substanzen konzentrieren konnten.

Aufgrund der höchsten relativen Reduktion des Lumineszenzsignals für Fraktion 13 (Abb. 3.21) wurde diese für eine weitere Auftrennung mittels HPLC und darauffolgender Rezeptorinteraktionsanalyse ausgewählt.

3.6.5 Die Auftrennung von Fraktion 13 mittels HPLC ergab vier Subfraktionen, von denen eine vergleichbare Signale zum ursprünglichen Überstand des *Pseudomonas aeruginosa* lieferte

Basierend auf den Ergebnissen der Vorfraktionierung und der deutlichen, signifikanten Interaktion zwischen Fraktion 13 und den Rezeptoren mGluR2 und GluR2/TAS1R3 erfolgte im Anschluss deren intensivere Charakterisierung und weitere Auftrennung mittels HPLC. Fraktion 13 konnte in vier Subfraktionen (13.1-13.4) aufgespalten werden (Abb. 3.22), die im Anschluss analog zur Vorfraktionierung im Rotationsverdampfer (zum Entfernen des Lösungsmittels) eingengt und gefriergetrocknet wurden. Für den anschließenden cAMP-Lumineszenzassay [465, 474] erfolgte eine Resuspension der einzelnen Subfraktionen in ddH₂O, unter Aufrechterhaltung des gleichen Volumens wie vor der Fraktionierung.

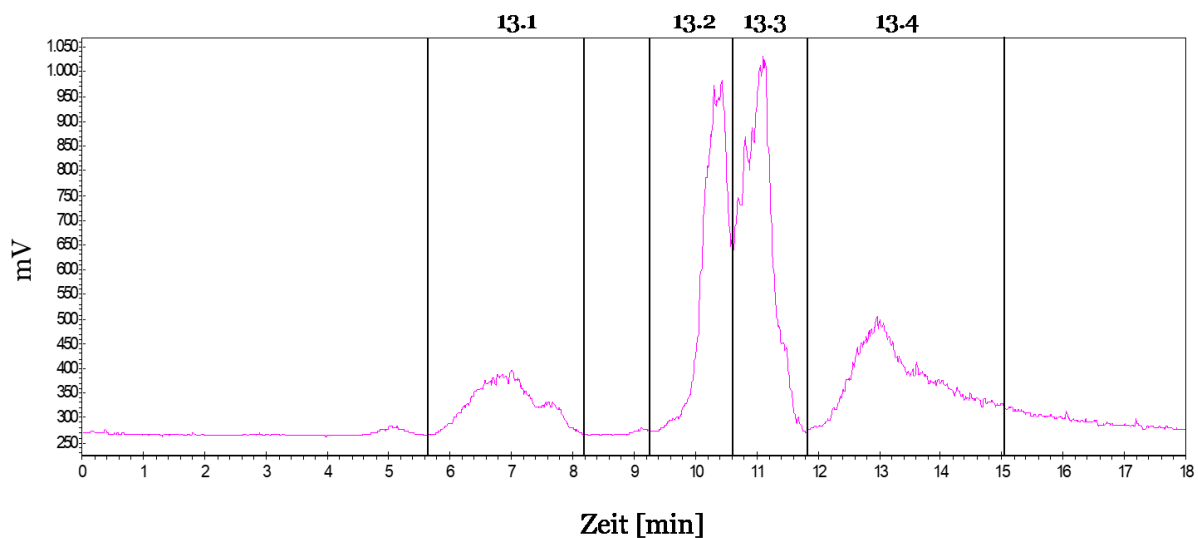


Abbildung 3.22: HPLC-Chromatogramm von Fraktion 13 des vorfraktionierten Überstandes von *Pseudomonas aeruginosa*. Die vertikalen, schwarzen Striche geben die Abgrenzungen der einzelnen Fraktionen an, die gesammelt wurden. Dabei stehen die Zahlen 13.1 – 13.4 für deren jeweilige Bezeichnung. Als HPLC-Säule fungierte die Xbridge BEH Amide, 130 Å, 10 mm x 250 mm, 5 µm mit den Fließmitteln 0,1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril (B). Die isokratische HPLC wurde mit 78% Acetonitril bei einem Druck von 5 ml/min durchgeführt.

Die Analyse der Interaktion zwischen den jeweiligen Fraktionen und Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 im Anschluss ergab signifikante Unterschiede sowohl zwischen der Negativkontrolle, dem Messpuffer, und den einzelnen Subfraktionen, als auch bei Vergleich der relativen Lumineszenzsignale der gesamten Fraktion 13 und ihrer Subfraktionen (Abb. 3.23). Mit Ausnahme von 13.1 konnten bei allen applizierten Proben sowohl für mGluR2 als auch für mGluR2/TAS1R3 signifikant geringere Lumineszenzsignale relativ zum Messpuffer beobachtet werden, gekennzeichnet durch Signifikanzsterne in Abb. 3.23, mit erneut jeweils niedrigeren Signalen für das Heterodimer im Vergleich zum Homodimer, während für TAS1R3 bei keiner der getesteten Fraktionen eine Rezeptorinteraktion in Form einer Signalreduktion detektiert werden konnte. Darüber hinaus zeigte die Analyse der Lumineszenzsignale

der jeweiligen Subfraktionen relativ zur Gesamtfraktion 13 signifikant höhere Werte für die Proben 13.1 und 13.3, während für die Subfraktionen 13.4 und insbesondere für 13.2 keine signifikanten Unterschiede zu Fraktion 13 beobachtet werden konnten (dargestellt durch unterschiedliche Buchstaben in Abb. 3.23). Insgesamt wies Subfraktion 13.2 mit 43 % für mGluR2 bzw. 64 % für mGluR2/TAS1R3 den höchsten relativen Signalabfall aller untersuchten Subfraktionen in Bezug auf den Messpuffer auf, der vergleichbar mit den Werten der gesamten Fraktion 13 war. Daher wurde diese Fraktion ausgewählt, um anhand nachfolgender, über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausgehenden, Analysen mittels NMR dessen Zusammensetzung zu identifizieren.

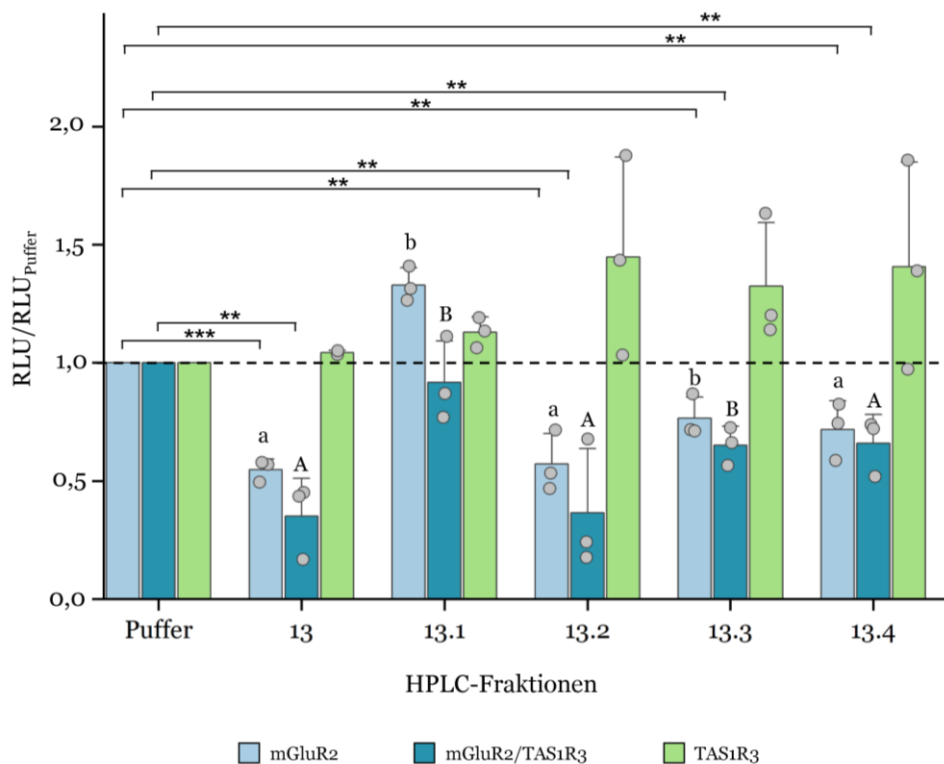


Abbildung 3.23: Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mGluR2, TAS1R3 und mGluR2/TAS1R3 mit einzelnen HPLC-Subfraktionen von Fraktion 13 des gefilterten *P. aeruginosa*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=3$ unabhängigen Experimenten. Die Mock-Kontrolle wurde abgezogen und die Daten auf das jeweilige Signal des Messpuffers normalisiert. Die gestrichelte Linie zeigt das Normalisierungsniveau an. Signifikanzen zwischen Messpuffer und der jeweiligen Fraktion erfolgte mittels zweiseitigem t-Test: (***) $p \leq 0,001$; (**) $p \leq 0,01$. Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen Fraktion 13 und den jeweiligen Subfraktionen an. Dabei beziehen sich Großbuchstaben auf die Unterschiede in Bezug auf das Heterodimer, Kleinbuchstaben auf das Homodimer mGluR2 ($p \leq 0,05$).

ZUSAMMENFASSUNG Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Ansätze und Screenings mit dem Ziel der Identifizierung potentieller Agonisten spezifisch für mGluR2/TAS1R3 lieferten wichtige Erkenntnisse nicht nur in Bezug auf das Heterodimer, sondern gleichermaßen hinsichtlich der einzelnen Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3, die eine

Grundlage für weiterführende Studien bieten. Mit Hilfe des Screenings proteinogener Aminosäuren sowohl in der L- als auch in ihrer D-Form konnten D-Leucin und D-Tryptophan als potentielle Agonisten für mGluR2 identifiziert werden, die weiterer Charakterisierung bedürfen. Dasselbe gilt für die Signalmoleküle PQS und *cis*-2-Dezensäure von *Pseudomonas aeruginosa*, die im cAMP-Lumineszenzassay mit TAS1R3 eine konzentrationsabhängige Interaktion aufzeigten.

Stimulationsexperimente mit 14 verschiedenen bakteriellen Überständen lieferten einen ersten, in Bezug auf die Fragestellung relevanten Hinweis über einen oder mehrere mögliche Agonisten spezifisch für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 im Überstand von *Pseudomonas aeruginosa*. Die weiterführende Charakterisierung ergab, dass es sich hierbei um eine oder mehrere maximal 1 kD große, nichtflüchtige und sehr polare Substanz(en) handeln muss. Weiterhin gelang es mit Hilfe der HPLC, den Überstand zunächst in 20 Fraktionen und die reaktivste Fraktion weiter in vier Subfraktionen aufzutrennen und dadurch eine deutliche Eingrenzung der potentiellen Agonisten zu erzielen. Letztlich konnte eine Subfraktion identifiziert werden, die die Grundlage für weitere, über diese Arbeit hinausgehende Analysen, bildet. Dabei soll in einem nächsten Schritt die entsprechende Subfraktion mittels NMR auf ihre Zusammensetzung hin untersucht und im Anschluss die entsprechenden Substanzen mit Hilfe des cAMP-Lumineszenzassays auf ihre Interaktion mit den jeweiligen Rezeptoren hin analysiert werden, mit dem Ziel, neben Mononatriumglutamat einen weiteren Agonisten zu identifizieren, der im Heterodimer einen Funktionsgewinn gegenüber mGluR2 aufweist und darüber hinaus eine bedeutsame Assoziation mit dem Immunsystem inne hat.

4.1 GPCRs und ihr Nachweis der Homo- und Heterodimerisierung

Die letzten 30 Jahre Forschung auf dem Gebiet der Klasse C GPCRs haben gezeigt, dass es sich bei diesen Proteinen um eine Rezeptorfamilie mit hoher physiologischer, pharmakologischer Relevanz und komplexen Signalmaschinerien handelt, deren Verteilung im menschlichen Körper sowie deren funktionales und höchstdiverses Spektrum bei weitem noch nicht vollständig verstanden sind [424]. Technologische Durchbrüche und methodische Verbesserungen auf Gebieten wie der Röntgenkristallographie, Kryo-Elektronenmikroskopie und strukturellem Modelling lieferten auf atomarer Ebene aufschlussreiche Strukturen dieser Rezeptoren und ihrer assoziierten Proteine [424, 539-542] und folglich ein besseres Verständnis über deren Aktivierungsprozesse, Effektorproteine, Signalling Pathways und Interaktionspartnern. Dazu zählt auch die wachsende Erkenntnis und Akzeptanz über die Anwesenheit von oligomeren GPCRs, welche sich nicht ausschließlich auf die Klasse C zu beschränken scheint, sondern vielmehr klassenübergreifend Gegenstand aktueller Forschungsfragen und –ansätzen ist. Ging man neben den Rezeptoren der Klasse C zunächst lediglich von dem Potential einiger strukturell wenig verwandter GPCRs zur Bildung von Homodimeren aus, wie dem β_2 -adrenergen Rezeptor [543-545], dem Adenosin- [546, 547] bzw. Dopamin D2 Rezeptor [548] sowie dem muskarinen [549, 550], Glukagon- [551] und δ -Opioidrezeptor [552], nimmt heute die Anzahl an bekannten heterodimeren GPCRs mit einer funktionellen Rolle stetig zu [553]. Neben den bekannten Heterodimeren der TAS1R-Familie sind hier beispielhaft Heteromere zwischen Adenosin- und Dopaminrezeptoren [554-559], dem Adenosin (A_{2A})- und β_1/β_2 -adrenergen Rezeptoren [560], dem Serotoninrezeptor 5-HT_{2A} und mGluR2 [561-563] bzw. dem (A_{2A})-Rezeptor und mGluR5 [562] zu nennen.

Aufgrund der Tatsache, dass GPCRs ein wichtiges therapeutisches Ziel zur Behandlung von insbesondere neurologischen Erkrankungen darstellen [564], ist ein grundlegendes Verständnis über deren Interaktionspartnern bzw. deren Heterodimerisierung von entscheidender Bedeutung. Die kombinatorische Vielfalt der Rezeptorkomplexe bietet ein enormes Potential sowohl für die Neurowissenschaften als auch die Arzneimittelforschung zur Entwicklung von Heteromer-spezifischen Medikamenten mit geringeren Nebenwirkungen [553], wie es bereits für das Antipsychotikum Clozapin in Zusammenhang mit dem Dopamin- und Serotonin-Rezeptor untersucht wurde [565]. Jedoch stellt die kombinatorische Komplexität der potentiellen Rezeptorheterodimere eine große Herausforderung sowohl in Bezug auf deren Nachweis und physiologische bzw. funktionelle Relevanz als auch letztlich hinsichtlich ihrer zugrundeliegenden biologischen Mechanismen dar.

In den vergangenen Jahren wurde eine enorme Anzahl molekularer Methoden zum Nachweis und Analyse von Rezeptorheterodimerisierungen, insbesondere im heterologen Zellsystem entwickelt. Die meisten dieser Techniken sind jedoch nicht in der Lage, diese Dimere in endogenem Gewebe nachzuweisen. Bis heute fehlen sensitive Instrumente und Methoden, um deren Anwesenheit im körpereigenen Gewebe zu untersuchen und ihr Verhalten unter normalen und pathologischen Bedingungen zu überwachen [566]. Wissenschaftler*innen auf dem Gebiet der GPCRs erarbeiteten einen „neuen konzeptionellen Rahmen für Rezeptorheteromere“, innerhalb dessen sie 3 Kriterien vorschlugen, die zum Nachweis eines Heteromers erfüllt sein müssen [567]: 1) Die Heteromere müssen in der gleichen Zelle, im gleichen subzellulären Kompartiment co-lokalisiert sein und physisch interagieren; 2) die Heteromere müssen einen eindeutigen „biochemischen Fingerabdruck“ besitzen, der sie von ihren jeweiligen Homomeren unterscheidet; und 3) eine Trennung des Heteromers führt zu einem Verlust der Interaktion und des einzigartigen „biochemischen Fingerabdrucks“. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Forschungsfrage der Heterodimerisierung zwischen zwei Klasse C GPCRs, mGluR2 und TAS1R3, behandelt. Das experimentelle Vorgehen und die Wahl der jeweiligen molekularen Methoden stehen dabei in Einklang mit den oben erwähnten Kriterien nach *Ferré et al.* [567]. Auf diese soll im Folgenden jeweils näher eingegangen werden sowie auf das Potential weiterer Methoden und Ansatzpunkte zur Untersuchung des Heterodimers mGluR2/TAS1R3.

1) HETEROMERE MÜSSEN IM GLEICHEN SUBZELLULÄREN KOMPARTIMENT CO-LOKALISIERT SEIN UND PHYSISCH INTERAGIEREN

Obwohl dieses Kriterium im ersten Moment trivial zu klingen scheint, ist dessen Nachweis, insbesondere im endogenen Gewebe, alles andere als leicht zu erbringen. So bedarf es einer Kombination an verschiedenen Techniken und Methoden, um schlüssig eine Co-Lokalisation belegen zu können. Heterologe Zellen, die die jeweiligen Rezeptoren mit unterschiedlicher Epitop-Markierung exprimieren, bieten eine Möglichkeit von Co-Lokalisationsstudien. Ein Vorteil dieser Methode ist die Verfügbarkeit von validierten und spezifischen Antikörpern gegen die jeweiligen getaggten Epitope. Anders verhält es sich in endogenen Zellen und Geweben: Bis heute steht die Wissenschaft vor dem Problem der geringen Verlässlichkeit und Verfügbarkeit von Antikörpern, spezifisch für den jeweiligen zu untersuchenden Rezeptor [568, 569]. Erschwerend kommt hinzu, dass Antikörper häufig nicht in der Lage sind, geringer exprimierte Rezeptoren zu detektieren. Aus diesem Grund müssen Sensitivität und Spezifität in diesem Kontext berücksichtigt werden [570, 571].

Im Rahmen dieser Studie wurde ein kombinatorischer Ansatz aus RNA- und proteinbasierten Methoden zum Nachweis der Co-Lokalisation von mGluR2/TAS1R3 gewählt. Die Daten der

qPCR lieferten dabei einen ersten wichtigen und in diesem Umfang bisher unbekanntem Hinweis über die Anwesenheit und dem Expressionsmuster aller 8 metabotropen Glutamatrezeptoren sowie der TAS1R-Familie in zwei unterschiedlichen Blutzelltypen, PMNs und T-Zellen. Während *Malki et al.* [222] TAS1R3 bereits als den Rezeptor mit der höchsten Expression innerhalb der TAS1Rs in diesen Zellen identifizieren konnte, bestätigen die hier vorliegenden Ergebnisse ihren Befund und weisen zusätzlich auf eine hohe Expressionsrate von insbesondere mGluR2 innerhalb der Gruppe der metabotropen Glutamatrezeptoren hin. Interessanterweise konnte diese Rate sowohl für *GRM2* als auch für *TAS1R3* nach einem 24-stündigen Stimulus mit MSG, um ein bis zu 2,4-faches erhöht werden. Dabei muss erwähnt werden, dass dieser Messwert nach 24 Stunden nur eine Momentaufnahme abbildet und nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Genexpressionsniveaus zu einem anderen Zeitpunkt hätte anders ausfallen können. Insgesamt betrachtet unterstreicht die Datenlage der qPCR-Experimente gleichwohl die Relevanz der beiden Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3 in Blutzellen und bildete in Bezug auf deren mögliche Heterodimerisierung eine Grundlage für nachfolgende Co-Lokalisationsstudien.

Obwohl eine erhöhte Genexpression nicht automatisch mit einer hohen Proteinkonzentration gleichzusetzen ist [572], so ist sie durchaus ein Indikator für eine wesentliche Relevanz dieser Gentranskripte im menschlichen Körper. Unter dem Aspekt der Co-Lokalisation wurde in diesem Zusammenhang auf Proteinebene eine Immunzytochemie mit spezifischen Antikörpern gegen mGluR2 bzw. TAS1R3 durchgeführt. Die Analyse lieferte den Nachweis der Expression beider Rezeptorproteine in denselben PMNs und zudem die wichtige und entscheidende Erkenntnis einer vollständigen Überlagerung der Antikörpersignale beider Rezeptoren – eine Voraussetzung für nachfolgende, weiterführende Co-Lokalisationsstudien. Interessanterweise scheinen in PMNs jedoch nicht alle Zellen diese Rezeptoren zu exprimieren, unabhängig ihres Auftretens in homo- oder heterodimerer Form. Eine Beobachtung, die sich mit aktuellen Studien deckt, die über die Existenz mehrerer Subpopulationen von Neutrophilen sowohl unter gesunden als auch krankheitsbedingten Bedingungen berichten, deren Funktionen jedoch noch weitestgehend unbekannt sind [573-578].

Während die Immunzytochemie die Anwesenheit beider GPCRs in derselben Zelle zeigen konnte, gibt diese Methode allein jedoch keinen Aufschluss über deren räumliche Nähe bzw. eine direkte Interaktion. Um diese Aspekte in den Kontext der Co-Lokalisierung von mGluR2 und TAS1R3 zu integrieren und näher zu beleuchten, kamen der BRET-Assay sowie eine Co-Immunoprecipitationsstudie zum Einsatz. Die gewählte Nano-BRET-Methode [495] in transfizierten HEK293-Zellen bestätigte die Ergebnisse aus der Immunzytochemie, indem eine räumliche Nähe beider Rezeptoren belegt werden konnte, die auf mögliche Protein-Protein-Interaktionen hindeutet. Diese Annahme manifestierte sich letztlich durch die Resultate der

Co-Immunopräzipitation in endogenen Zellen, die nicht nur die Anwesenheit beider GPCRs in PNM's und T-Zellen nachwies, sondern vielmehr deren direkte Interaktion als Proteinkomplex demonstrierte. Durch die im Vorfeld durchgeführte Antikörpervalidierung in transfizierten NxG-Zellen kann eine Interaktion des mGluR2-Antikörpers mit anderen mGluRs (mit Einschränkung von mGluR3) oder TAS1Rs ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für den TAS1R3-Antikörper. Eine unerwünschte Interaktion der gewählten Antikörper mit anderen Rezeptoren auf Blutzellen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. *Dahl et al.* [579] untersuchten in einer kürzlich erschienenen Studie die Spezifität von über 400 anti-GPCR Antikörpern auf 215 GPCRs aller Subfamilien. Nur 61 % der Antikörper waren selektiv für ihre eigentlichen Targets, während 11 % zusätzlich an „Off-Targets“ und 28 % an gar keine GPCRs banden. Diese Problematik konnte auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden. Es bedurfte der Testung von 8 unterschiedlichen, kommerziell verfügbaren anti-mGluR2-Antikörpern, bis letztlich ein spezifischer Antikörper validiert werden konnte, der keine Interaktion mit den anderen getesteten Rezeptoren aufwies bzw. eine korrekte Bandengröße zeigte.

Ein entscheidender Punkt, der in diesem Zusammenhang neben der Antikörperspezifität jedoch nicht vernachlässigt werden darf und insbesondere bei der Durchführung von Co-IPs beachtet werden muss, ist die Fähigkeit der GPCRs zur Kompartimentalisierung in Membran-Nanodomänen, auch Lipid Rafts genannt. Dabei handelt es sich um dynamische, dicht gepackte Membranbereiche mit erhöhten Konzentrationen an Glycosphingolipiden und Cholesterin, innerhalb derer GPCRs häufig zusammen mit ihren Signalproteinen lokalisiert sind [580-582] und die entscheidende GPCR-Funktionen, wie der Anordnung, Organisation, Stabilität und dem Signalling besitzen [583]. Auch metabotrope Glutamatrezeptoren scheinen mit Lipid Rafts assoziiert zu sein [584, 585] und zeigen, wie im Falle von mGluR1, die Anwesenheit von 6 Cholesterinmolekülen zwischen den Rezeptorprotomeren auf [11]. Eine unvollständige Solubilisierung in Form eines zu milden Lyosedetergenz bzw. einer zu geringen Zentrifugationsgeschwindigkeit können dazu führen, dass diese Nanodomänen während der Proteinpräparation intakt bleiben [586]. So besteht die Gefahr, dass anstelle eines tatsächlichen Proteinkomplexes co-exprimierte GPCRs innerhalb von Lipid Rafts nachgewiesen werden, die in keinem direkten Kontakt zueinanderstehen. Ein bekanntes Beispiel stellt in diesem Zusammenhang das Sehpigment Rhodopsin, ein Klasse A GPCR, dar. Aufgrund der hohen Dichte von Rhodopsin in den Stäbchenmembranen von 30 000 – 55 000 Monomeren pro μm^2 [587] ist bis heute nicht abschließend geklärt, in welcher Form dieses Molekül funktional im Körper interagiert. Bekannt ist, dass es als Oligomer in Reihen von Dimeren in der Membran vorliegt und Nanodomänen bildet [587-591]. Jedoch herrscht nach wie vor Unklarheit über die funktionelle Rolle dieser Dimerisierung, da in biochemischen Assay sowohl die monomere als auch dimere Form des Proteins eine vollständige Signaltransduktion aufweist [592, 593].

Um eine vollständige Solubilisierung der Proteine zu gewährleisten, wurde im Rahmen der

vorliegenden Arbeit bei Durchführung der Co-IP der RIPA-Puffer als Lysis-Detergenz verwendet. Dabei handelt es sich um ein, im Vergleich zu anderen gängigen Puffern wie Triton-X oder NP-40, starkes Reagenz, das auch Kernmembrane zerstören kann. Zudem erfolgte die Zentrifugation bei 12 000 g, für PMNs zusätzlich bei 15 000 g nach *Hall et al.* [459], Geschwindigkeiten, die beide weit über der g-Zahl der Herstellerangaben des Dynabeads™ Co-Immunopräzipitationskits lagen und signifikante Banden der erwarteten Größe von ~100 kDa erbrachten.

Zusammenfassend lieferte die gezielte Wahl an vielfältigen molekularbiologischen Methoden mit unterschiedlichen Prinzipien in der vorliegenden Arbeit entscheidende Argumente für die Annahme einer Co-Lokalisation von mGluR2 und TAS1R3 sowohl in heterologen als auch endogenen Zellen und legt zudem wesentliche Hinweise auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion sowie dem Vorliegen beider Rezeptoren als Proteinkomplex in den untersuchten Blutzellen dar. Weitere Methoden, die neben den hier verwendeten zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen in Verbindung mit GPCRs herangezogen werden können, sind unter anderem die zeitlich aufgelöste FRET (trFRET) (Förster-Resonanzenergietransfer), die in-situ RNA-Hybridisierung oder der LBD-complementation Assay. Die trFRET erfolgt nach einem ähnlichen Prinzip wie der in dieser Arbeit verwendete BRET-Assay, mit dem Unterschied, dass die räumliche Nähe von Proteinen hier in Form von Fluoreszenz und nicht mittels Biolumineszenz gemessen wird. Für ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis verwendet diese Methode Fluorophore mit langer Fluoreszenzlebensdauer und wird häufig in high-throughput Screenings eingesetzt [594, 595]. Zudem diente die trFRET bereits mitunter zum Nachweis der Heterodimerisierung von mGluRs [430, 435, 437].

Für den Nachweis eines mGluR2/mGluR3 Heterodimers verwendeten *Lee et al.* [443] neben der Co-IP die FISH (Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung) an Gehirnschnitten von Mäusen. Dabei kamen fluoreszenz-markierte RNA-Sonden, spezifisch gegen *GRM2* bzw. *GRM3* zum Einsatz. Diese zeigten ein überlappendes Signal beider Fluorophore, ähnlich der Immunzytochemie in der vorliegenden Arbeit, die jedoch auf dem Fluoreszenzsignal spezifischer Antikörper basiert.

Einen neuen Ansatz zum Nachweis von Dimerisierungen innerhalb von Klasse C GPCRs lieferte dieselbe Arbeitsgruppe in Form des LBD-Komplementationsassays [443]. Kristallstrukturen von mGluRs zeigten einen nach Bindung von Glutamat verringerten Abstand zwischen den C-Termini der LBD dieser Rezeptoren und daraus folgernd, dass hauptsächlich diese Domänen für die Dimerisierung verantwortlich zu sein scheinen [116, 123]. Basierend auf diesem Erkenntnis entwickelten *Lee et al.* [443] einen dreifarbigem Fluoreszenzassay (Abb. 4.1). Das Prinzip beruht auf der Co-Expression der N-terminal markierten LBD eines mGluRs („SNAP-mGluRy-LBD“) mit einem weiteren C-terminal GFP-markierten mGluR („mGluRx-GFP“). Zu-

nächst werden die Zellen dabei mit einem Membran-impermeablen Alexa-647 Fluorophor inkubiert, der SNAP-mGluRy-LBD sowohl in ungebundener Form als auch im Heterodimer mit mGluRx-GFP an der Zelloberfläche markiert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Inkubation mit einem Membran-permeablen Fluorophor, BG-TMR, der intrazelluläres SNAP-mGluRy-LBD kennzeichnet. Das abschließende Waschen der Zellen entfernt ungebundene SNAP-mGluRy-LBDs und die Intensität der Alexa647-Fluoreszenz kann als Maß für die Effizienz der Bindung von SNAP-mGluRy-LBD durch mGluRx-GFP verwendet werden. Die Fluoreszenzen von TMR und GFP dienen zur Kalibrierung der Expression unter verschiedenen Bedingungen [443]. Diese Methode lieferte in der Studie die Möglichkeit zur Bestimmung der relativen Homo- und Heterodimer-Anteile von mGluRs der Gruppen I, II und III. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Dimerisierungssignal in diesem Assay ausschließlich auf Wechselwirkungen auf der LBD-Ebene beruht und zusätzlich von der Bildung einer Disulfid-Bindung zwischen beiden Rezeptorprotomeren abhängig ist.

Sowohl der tf-FRET, die FISH und Methoden der Bioinformatik (molecular modelling) als auch dieser Assay bilden weitere Ansatzpunkte zur Identifizierung von Protein-Proteininteraktionen. Jedoch bedarf es einer systematischen Planung und Selektion von unterschiedlichen Methoden um bestenfalls sowohl *in silico*, als auch in heterologen und endogenen Zellen eine Co-Lokalisation und Interaktion der Rezeptoren nachweisen zu können.

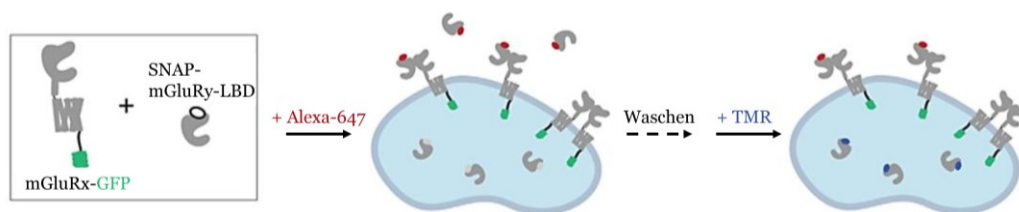


Abbildung 4.1: LBD-Komplementationsassay als Methode zur Detektion der Dimerisierung von GPCRs der Klasse C. Abbildung verändert nach Lee et al. (2020) [443].

2) HETEROMERE MÜSSEN EINEN EINDEUTIGEN „BIOCHEMISCHEN FINGERABDRUCK“ BESITZEN, DER SIE VON IHREN JEWEILIGEN HOMOMEREN UNTERSCHIEDET.

Eine Co-Lokalisation bzw. der Nachweis einer Protein-Proteininteraktion liefert zwar einen ersten Anhaltspunkt für eine Rezeptorheterodimerisierung, dieses Kriterium alleine ist jedoch nicht ausreichend, um eine Funktionalität in Form eines „biochemischen Fingerabdrucks“ nachzuweisen. Vielmehr benötigt es die fundierte Analyse des potentiellen Heteromers hinsichtlich dessen Ligandenbindung, Signaltransduktion und biochemischer Signalkaskaden bzw. Trafficking, um eindeutige heteromerspezifische Eigenschaften aufzeigen zu können [567, 596]. So belegten beispielsweise BRET, Co-IP [597, 598] und in-situ-Hybridisierungsexperimente [599] die Fähigkeit von Bitterrezeptoren zur Oligomerisierung [597, 598] bzw. der

Co-Expression von 4-11 TAS2Rs in humanen Zungenpapillen [599], ein funktioneller Nachweis bzw. vorteilhafter Effekt der Oligomere im Vergleich zu ihren entsprechenden Monomeren konnte jedoch bisher nicht erbracht werden [597]. Ähnliches gilt für das beschriebene Rhodopsin-Molekül [592, 593] wie auch für einige der bereits identifizierten Heterodimere innerhalb der Familie der metabotropen Glutamatrezeptoren [430, 437].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein kombinatorischer Ansatz gewählt, bestehend aus Methoden sowohl zur Identifizierung von heteromer-spezifischen Trafficking- als auch Signalling-Eigenschaften in heterologen und endogenen Zellen (PMNs). Die Oberflächenexpressionsanalyse in transfizierten HEK-293 Zellen ergab eine im Vergleich zum Homodimer mGluR2 signifikante Erhöhung des relativen Alexa Fluor® 488 Fluoreszenzsignal von mGluR2/TAS1R3 und folglich eine höhere Oberflächenexpression. TAS1R3 scheint im Heterodimer die Lokalisierung von mGluR2 an die Zelloberfläche zu erleichtern – ein Verhalten, das bereits für den Typ 1 Cannabinoidrezeptor (CB1R) im Heterodimer mit dem δ -Opioidrezeptor (δ OR) gezeigt werden konnte [600]. Die Tatsache, dass Dimerisierungen von Rezeptorhomomeren in erster Linie dem funktionellen GPCR-Signalling zu dienen scheinen, schließt jedoch eine mögliche Relevanz des Zusammenschlusses von Protomeren für andere Zwecke der GPCR-Biologie nicht aus [601]. Mehrere Studien berichten von einer konstitutiven, Rezeptoraktivierungs-unabhängigen Dimerisierung einiger GPCRs [602-607], die früh im Biosyntheseprozess, höchstwahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum (ER) stattfindet [586, 601, 603, 608, 609] und auf eine weitere Rolle der Rezeptordimerisierung hindeuten könnte. Befunde bekannter Heterodimere verstärken diese Annahme: So scheint die frühe Heterodimerisierung der GABA_B-Rezeptoruntereinheiten, GABA_{B1} und GABA_{B2}, während der Biosynthese einen wesentlichen Schritt für die Zelloberflächenexpression des Rezeptors darzustellen. Die Interaktion der C-terminalen Coiled-Coil α -Helices beider Untereinheiten maskiert das ER-Retentionssignal von GABA_{B1} und ermöglicht auf diese Weise einen Export des funktionellen Heterodimers an die Plasmamembran [610, 611]. Ähnliche Mechanismen konnten auch für den Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3 [612] und die α_{1D} - und α_{1B} -Adrenorezeptoren [613] gezeigt werden, was darauf hindeutet, dass diese Art und Funktion der Dimerisierung eine häufigere Methode darstellen könnte, als bisher angenommen.

Neben einer erhöhten Oberflächenexpression des Heterodimers im Vergleich zu mGluR2 konnte mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten funktionalen cAMP-Lumineszenzassays ein weiterer „biochemischer Fingerabdruck“ von mGluR2/TAS1R3 identifiziert werden, der auf einer verbesserten, rezeptorvermittelten, intrazellulären Signalgebung beruht. Konzentrationswirkungsbeziehungen in transfizierten HEK-293 Zellen mit MSG ergaben einen heteromerabhängigen MSG-induzierten Funktionsgewinn in Form eines verringerten Forskolin-aktivierten cAMP-Signals und folglich einen signifikant geringeren IC₅₀-Wert von

mGluR2/TAS1R3 im Vergleich zum Homodimer mGluR2. Interessanterweise konnte eine Verringerung der Potenz gegenüber MSG ausschließlich bei Interaktion von mGluR2 mit TAS1R3 beobachtet werden, während TAS1R1 bzw. TAS1R2 im Heteromer mit mGluR2 keine signifikanten Unterschiede der IC_{50} -Werte zwischen Homo- und Heterodimer aufwiesen. Dieser Befund lässt auf eine mGluR2/TAS1R3-spezifische Interaktion beider Rezeptoren schließen, die die Annahme einer möglichen Heterodimerisierung, auch unter Berücksichtigung der bereits dargestellten Ergebnisse aus Co-Lokalisations- und Trafficking-Experimenten, bekräftigen. Die Beobachtung, dass ein Rezeptorprotomer zu einer verringerten Potenz eines Agonisten für die Aktivierung eines Heteromers führen kann, ist ein wesentliches Charakteristikum für die Identifizierung von G-Protein gekoppelten Rezeptorheteromeren [596] und diente beispielsweise für die Heterodimere CB1R/ δ OR [600], ORL1 (*engl.* opioid receptor like-1 receptor)/ μ -Opioidrezeptor [614] und mGluR2/mGluR7 [435] mit für deren Nachweis.

Grundsätzlich stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, welchen Beitrag TAS1R3 im Heterodimer mit mGluR2 leistet. Sind beide Protomere zu gleichen Teilen am Signalling beteiligt und welches G-Protein ist im Rezeptordimer hauptsächlich für die Signaltransduktionsmechanismen verantwortlich? Studien von heterodimeren mGluRs weisen darauf hin, dass sich der Beitrag der einzelnen Rezeptoruntereinheiten in den jeweiligen Heteromeren in Abhängigkeit von den jeweiligen Rezeptorkombinationen hinsichtlich der Ligandenbindung als auch der daraus resultierenden Transduktionsmechanismen durchaus unterscheiden kann. So konnten *Werthmann et al.* [442] mittels funktionalen Komplementationsassays im Heterodimer mGluR1/mGluR5 eine symmetrische Signaltransduktion aufzeigen, die auf einer gleichwertigen Beteiligung beider Protomere an der G-Proteinaktivierung beruht. Im Gegensatz dazu demonstrierten Mutationsstudien von *Liu et al.* [441], dass im Heterodimer mGluR2/mGluR4 ausschließlich die Transmembrandomäne (TMD) von mGluR4 das G-Protein (G_q) aktiviert, obwohl mGluR2 seine Funktion der G-Protein-Aktivierung nicht verloren hat. Dabei scheint sich dieses Phänomen nicht ausschließlich auf diese Rezeptorkombination zu begrenzen, sondern vielmehr für alle Heterodimere bestehend aus Untereinheiten der Gruppen III und mGluR2 gültig zu sein [441]. Ein ähnlicher Transduktionsmechanismus wird in der Literatur für den Süß- und Umamirezeptor beschrieben – in beiden Fällen sind ausschließlich die TMDs von TAS1R1 bzw. TAS1R2 und nicht TAS1R3 für die Aktivierung des G-Proteins verantwortlich [615, 616]. Trotzdem scheint diese Untereinheit einen entscheidenden Beitrag in den jeweiligen Rezeptorheterodimeren zu leisten, da die Abwesenheit von TAS1R3 in knock-out Mäusen mit einer verringerten Antwort auf Süß- bzw. Umamistimuli einherzugehen scheint [182].

Ein ähnliches Verhalten von TAS1R3 könnte auch im Heterodimer mit mGluR2 gelten. Die Konzentrationswirkungsbeziehungen ergaben ein in Anwesenheit von TAS1R3 potenteres Rezeptorkonstrukt. Jedoch konnte auch für das Homodimer mGluR2 alleine ein funktionales Signalling beobachtet werden, wenn auch mit einem signifikant höherem IC_{50} -Wert, was für eine

G-Proteinaktivierung und Ligandenbindung via mGluR2 spricht. Eine alleinige Reaktion von TAS1R3 auf MSG blieb erwartungsgemäß aus. Die Aminosäure bindet bekanntermaßen im Umamirezeptor in der Venus Fly Trap Domäne des TAS1R1-Protomers, nicht aber an TAS1R3 [181, 617], sodass der TAS1R3 Rezeptor alleine nicht den kanonischen Signalweg aktivieren kann.

So ist es möglich, dass TAS1R3 im Heteromer mGluR2/TAS1R3 in erster Linie nicht für dessen Funktionalität verantwortlich ist, sondern vielmehr als Chaperonprotein die korrekte Faltung und effiziente zelluläre Translokation des Dimers zur Zelloberfläche erleichtert, wie in der Oberflächenexpressionsanalyse gezeigt werden konnte. Weitere Analysen, bspw. in Form von Mutations- oder Modellingstudien sind notwendig, um die funktionelle Rolle von TAS1R3 im Heterodimer mit mGluR2 vollständig aufklären zu können.

Entsprechendes gilt für die Identifizierung des für die Signaltransduktion verantwortlichen G-Proteins. Die Ergebnisse des cAMP-Lumineszenzassays im heterologen Zellsystem lieferten in diesem Zusammenhang erste Hinweise: Interessanterweise konnte mit allen getesteten G_{α} -Untereinheiten ein signifikant potenteres Rezeptorkonstrukt bei Co-Expression von TAS1R3 im Vergleich zum Homodimer mGluR2 erhalten werden. Die deutlich geringeren IC_{50} -Werte gegenüber den anderen getesteten $G_{\alpha i}$ -Proteinen sprechen für eine mögliche Beteiligung von $G_{\alpha i3}$, einem G_i -Protein, das bekanntermaßen mit mGluR2 interagiert [618] und dessen Möglichkeit zur Kopplung zudem mit dem Süß- und Umamirezeptor nachgewiesen werden konnte [619]. Es bieten sich jedoch weitere Experimente wie bspw. der GTP γ S-Bindungsassay [620] an, um gezielt in endogenen Blutzellen das physiologisch relevante G-Protein identifizieren zu können.

3) DIE TRENNUNG DES HETEROMERS FÜHRT ZU EINEM VERLUST DER INTERAKTION UND DES EINZIGARTIGEN „BIOCHEMISCHEN FINGERABDRUCKS“

Die beschriebenen Ergebnisse der Oberflächenexpression und cAMP-Lumineszenzmessungen lieferten konkrete Nachweise eines heterodimer-spezifischen „biochemischen Fingerabdrucks“, einen direkten Bezug zum physiologisch relevanten Milieu der endogenen Zellen legten letztendlich jedoch die Daten aus ELISA- und Ca^{2+} -Experimenten isolierter PMNs dar. Nach *Ferré et al.* [567] führt eine Trennung des Heteromers zu einem Verlust der Interaktion und dieses „biochemischen Fingerabdrucks“. Obwohl das Homodimer TAS1R3 im cAMP-Lumineszenzassay alleine keine Antwort gegenüber MSG in Form einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung aufzeigte, scheint der TAS1R3-spezifische Antagonist Lactisol in der Lage zu sein, die durch MSG vereinfachte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion in Neutrophilen zu hemmen. Dies könnte zum einen auf eine blockierende Funktion von Lactisol über die Untereinheit von

TAS1R3 im mGluR2/TAS1R3 Heterodimer hindeuten und indiziert zugleich, dass das Homodimer mGluR2 für den beobachteten Anstieg der MSG-abhängigen fMLF-bedingten IL-8 Sekretion alleine nicht verantwortlich zu sein scheint. Gleichzeitig blockiert der receptorspezifische mGluR2 Antagonist 1 in gleichem Maße die MSG-begünstigte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion, die eine potentielle Beteiligung des Umami-Rezeptors TAS1R1/TAS1R3 in diesem Zusammenhang unwahrscheinlich erscheinen lässt, zumal ein rekombinanter Umamirezeptor für dessen Aktivierung Glutamatkonzentrationen von weit über 50 μM im millimolaren Bereich benötigt [163]. Vielmehr könnte basierend auf diesen Beobachtungen ein Heterodimer aus mGluR2 und TAS1R3 die oben beschriebene erhöhte IL-8 Sekretion in MSG vorstimulierten PMNs vermitteln.

Bereits Ende der 90er Jahre berichteten *Kuhns et al.* [502] von einer kalziumabhängigen Bildung und Freisetzung von IL-8 in humanen Neutrophilen. Die Tatsache, dass sowohl MSG als auch der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 in isolierten PMNs eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Fluoreszenz induzierte, die für beide Substanzen durch den mGluR2 Antagonisten 1 gehemmt werden konnte, spricht für eine vorwiegende Beteiligung von mGluR2 in Bezug auf die MSG-abhängige fMLF-bedingte IL-8 Sekretion. Diese Hypothese deckt sich mit den Ergebnissen und der Analyse der cAMP-Lumineszenzmessungen, die bereits in erster Linie den metabotropen Glutamatrezeptor als Hauptakteur für das funktionelle Signalling in Antwort auf MSG identifizierten. Trotz des Einsatzes receptorspezifischer Agonisten und Antagonisten kann jedoch die Anwesenheit und Beteiligung anderer mGluR-Homo-/Heterodimere bzw. mGluR/TAS1R3-Heteromeren nicht ausgeschlossen werden, sodass weitere Studien beispielsweise mit siRNA-gesteuerten, receptorspezifischen Knockdown-Experimenten notwendig sind, um sowohl die funktionelle Rolle des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 als auch die Beiträge der einzelnen Untereinheiten vollständig aufklären zu können.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine in Abhängigkeit von mGluR2/TAS1R3 vermittelten MSG-begünstigte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion, die jedoch auf einem Zusammenspiel der Signalwege zwischen dem Heterodimer und dem durch fMLF aktivierten FPR1-Rezeptor zu basieren scheinen. Die gegenseitige Modulation der Signalwege unterschiedlicher GPCRs, die heterologe Sensibilisierung sowie ein vereinfachtes fMLF/FPR1-induziertes Kalzium-Signalling sind bekannte Mechanismen von Neutrophilen [228, 621-623] und könnten auch ein kausales Wirkungsprinzip der im Rahmen dieser Arbeit beobachteten erhöhten MSG-abhängigen IL-8 Sekretion bedeuten. Daraus lässt sich die Annahme ableiten, dass die Anwesenheit von MSG bzw. eines anderen endogenen Stimulus/Metaboliten gemeinsam mit DAMPs (*engl.* Damage-associated molecular pattern) oder PAMPs (*engl.* Pathogen-associated molecular patterns) wie bspw. fMLF im Allgemeinen zu einer erleichterten oder zumindest modulierenden zellulären Immunreaktion führen könnte. In einer Studie mit Neutrophilen konnten *Mol et al.*

[624] nachweisen, dass tatsächlich eine doppelte Stimulation zweier unterschiedlicher Rezeptoren notwendig ist, um eine optimale neutrophile Degranulation, Zytokinfreisetzung, ROS-Produktion und extrazelluläre Vesikelfreisetzung zu induzieren. Aufgrund der Beobachtung einer durch TAS1R3 vereinfachten bzw. verbesserten Oberflächenexpression von mGluR2 und der Tatsache, dass mGluR2, nicht aber mGluR3, weder eine schnelle glutamatinduzierte, GRK-vermittelte Desensibilisierung noch eine Arrestin-vermittelte Internalisierung aufweist [625, 626] könnte das Heterodimer auf Leukozyten als konstitutiver, molekularer Sensor fungieren, um endogene bzw. mikrobielle Bestandteile oder Metaboliten im Blutkreislauf bzw. in Grenzepithelien, wie den Peyer's patches, zu erkennen und ggf. zu reagieren [474]. Einen Anhaltspunkt dafür liefern die Ergebnisse des cAMP-Lumineszenzassays, die eine Interaktion des Heterodimers mit bakteriellen Überständen, insbesondere von *Pseudomonas aeruginosa* aufzeigten. Auf diesen Zusammenhang wird im nachfolgenden Kapitel eingegangen.

Eine (i) Co-Lokalisation bzw. physikalische Interaktion, (ii) das Aufweisen eindeutiger heteromerer Eigenschaften, die sie von ihren Protomeren unterscheidet und (iii) veränderte Charakteristika des Rezeptors nach Hemmung bzw. Trennung der jeweiligen Homomere. Diese drei Kriterien müssen nach *Ferré et al.* [567] erfüllt sein, um von einem Nachweis eines Heterodimers sprechen zu können [596]. Zwei der drei zu fordernden Heteromereigenschaften konnten für mGluR2/TAS1R3 dargestellt werden: Die Umsetzung eines multimethodischen Ansatzes bestehend sowohl aus RNA- als auch protein- und funktionsbasierten Techniken in heterologen HEK-293 Zellen sowie in endogenen humanen Blutleukozyten lieferte eindeutige Argumente für die Anwesenheit des Heterodimers mGluR2/TAS1R3. Die Co-IP zusammen mit der Immunhistochemie und dem BRET-Assay wiesen plausibel die Co-Expression beider Protomere in humanen PMNs nach und konnten zudem deren Interaktion bestätigen. Weiterhin lieferten die Oberflächenexpressionsanalyse und der im Rahmen dieser Arbeit etablierte cAMP-Lumineszenzassay eindeutige heteromerspezifische Signalling- und Trafficking-Eigenschaften in Form einer verbesserten Oberflächenexpression und verbesserten Potenz – eines geringeren IC₅₀-Wertes. Mit Hilfe rezeptorspezifischer Agonisten und Antagonisten gelang es letztlich in frisch isolierten humanen PMNs sowohl mit Lactisol als auch dem mGluR2 Antagonist 1 die erhöhte MSG-bedingte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion auf dasselbe Level der unstimulierten Zellen zu inhibieren, was für einen Beitrag beider Rezeptoren in diesem Zusammenhang spricht. Zudem zeigten humane PMNs bei Stimulation mit dem mGluR2-spezifischen Agonisten LY379268 sowohl hinsichtlich ihrer IL-8 Sekretion als auch in Ca²⁺-Messungen im Vergleich zum MSG keinen signifikanten Unterschied, was ein Anhaltspunkt für eine Beteiligung von hauptsächlich mGluR2 und keinem anderen metabotropen Glutamatrezeptoren zu sein scheint. Es bedarf jedoch weiterer experimenteller Ansätze, um letztlich die Funktion des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 in humanen Blutleukozyten vollständig aufklären zu

können. Abbildung 4.2 liefert in diesem Zusammenhang einen detaillierten Überblick der drei diskutierten Kriterien und gibt zudem mögliche experimentelle Ansatzpunkte, die zusätzlich zu den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden durchgeführt werden könnten.

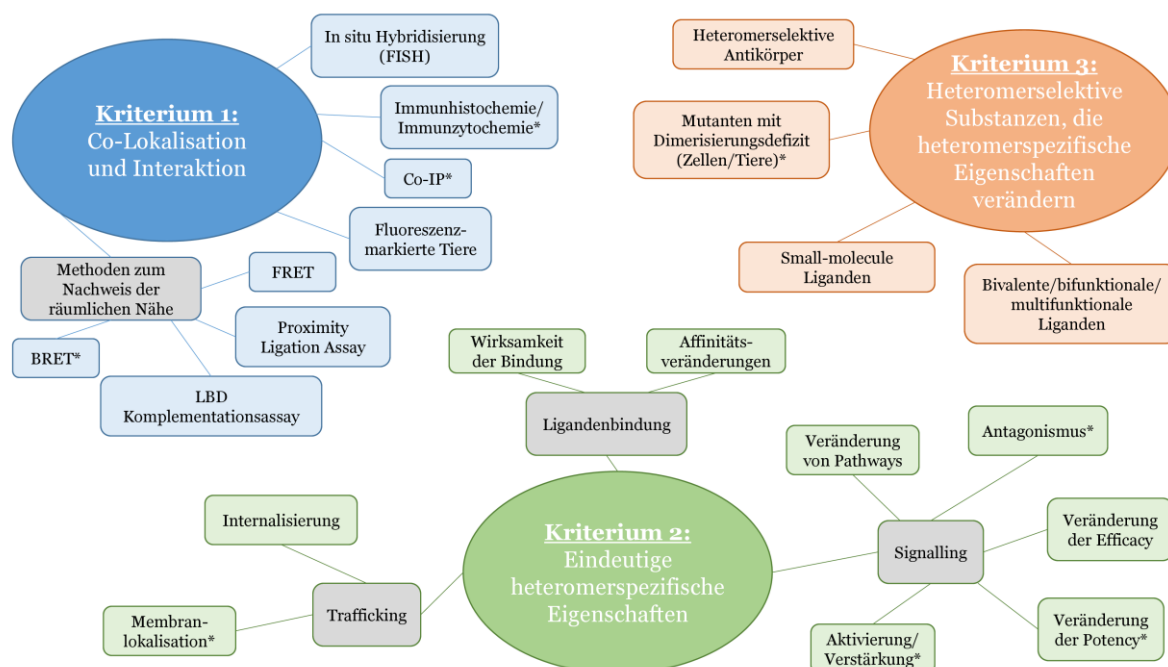


Abbildung 4.2: Drei Kriterien und ihre jeweiligen Ansätze zum Nachweis einer Heterodimerisierung von GPCRs. Die mit einem * markierten experimentellen Ansätze wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Identifizierung und Charakterisierung des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 herangezogen. Abbildung modifiziert nach Gomes et al. (2015) [596].

4.2 Identifizierung potentieller Agonisten für das Heterodimer mGluR2/TAS1R3

4.2.1 Mononatriumglutamat

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lieferten die Grundlage für den Nachweis des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 in humanen Blutleukozyten. Im Zusammenhang mit dessen funktioneller Analyse stellt sich demgemäß die Frage nach möglichen potentiellen Agonisten. Basierend auf ihren bekannten Wirkungen als metabotrope Glutamatrezeptoren bzw. als Teil des Umami-Rezeptors teilen sich mGluR2 und TAS1R3 den gleichen Agonisten, den Neurotransmitter und die Aminosäure L-Glutamat. Insbesondere der cAMP-Lumineszenzassay in HEK-293 Zellen zeigte in Antwort auf MSG ein gegenüber dem mGluR2-Dimer potenteres Rezeptorkonstrukt auf, dessen potentielle Funktion im Heterodimer unter Berücksichtigung der bedeutenden Relevanz von Glutamat für das Immunsystem nicht unbeachtet gelassen werden sollte.

Nicht zuletzt der Nachweis einer spezifischen Bindung von Glutamat an humane Blutlymphozyten [409] und die Anwesenheit von ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren [229, 231, 233, 368, 404, 410-412] führten zu der Erkenntnis einer zusätzlichen funktionalen Rolle der Aminosäure, die weit über deren Funktion als bekannter Neurotransmitter oder Vorläufer für die Proteinsynthese hinaus geht. So scheint Glutamat eine Art Schlüsselrolle für den Cross-Talk zwischen dem Nervensystem (als zentraler Neurotransmitter) und dem Immunsystem (als extrazellulärer Signalvermittler) einzunehmen [388]. Studienergebnisse legen nahe, dass sowohl der Aktivierungszustand von Immunzellen als auch die vorwiegende Expression verschiedener GluR-Subtypen auf diesen Zellen abhängig von den jeweils vorherrschenden Glutamatkonzentrationen sind [229, 408, 627]. Dies deutet auf einen präzisen Regulationsmechanismus der Leukozytenfunktionen hin, der möglicherweise durch Glutamat gesteuert und kontrolliert wird [388].

Tatsächlich scheint die Aminosäure in Abhängigkeit ihrer Konzentration verschiedene Eigenschaften und Funktionen von T-Zellen sowohl aktivieren als auch unterdrücken zu können: Physiologisch geringe Glutamatkonzentrationen ($\sim 10^{-9}$ - 10^{-8} M) induzieren in naiven T-Zellen über den ionotropen Glutamatrezeptor 3 (iGluR3) die Adhäsion an Fibronektin und Laminin, zwei Glykoproteine der extrazellulären Matrix [628], welche unter physiologischen und pathologischen Bedingungen für die Migration und die Ansiedlung von T-Zellen in Geweben essentiell notwendig ist [488]. In physiologischen mikromolaren Konzentrationen ($\sim 10^{-5}$ M) agiert Glutamat auf aktivierten T-Zellen über die dort verstärkt exprimierten mGluRs 1+5 [229, 627] sowie iGluRs [233]. In Folge der Antigen-Bindung verlieren die Zellen durch enzymatische Abspaltung mittels Granzym B die iGluR3-vermittelte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und folglich die ihre pro-migratorischen Funktionen [629], da in ihrem aktivierten Zustand in erster Linie eine in Antwort auf die Antigen-Bindung erhöhte Zellproliferation im Vordergrund steht. Diese wird zum einen durch einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg vermittelt, der durch die Ca^{2+} Freisetzung aus dem ER und der Aktivierung von CRAC-Kanälen (*engl.* calcium release-activated Ca^{2+} channels) [630] sowie spannungsabhängigen K^{+} -Kanälen (Kv1.3 Kanäle) erfolgt, welche durch Glutamat via iGluRs und mGluRs der Gruppen I und II reguliert werden [229, 233, 412]. Weiterhin fördert Glutamat in diesen physiologischen Konzentrationen die Zellproliferation, indem es über mGluR1 T-Zellen vor dem apoptotischen AICD (*engl.* activation induced cell death) schützt [232].

Erhöhte Glutamatkonzentrationen ($\sim 10^{-3}$ M) sind ein Anzeichen für pathologische Veränderungen [130]. So scheinen Entzündungen mit einem Anstieg der Glutamatkonzentrationen assoziiert zu sein und auch im Wundwasser sind große Mengen der Aminosäure zu finden [418]. Zudem konnten mehrere Studien für eine Vielzahl an Erkrankungen, die mit Entzündungen einhergehen, erhöhte periphere Glutamatkonzentrationen diagnostizieren [130], darunter die akute und chronische myeloische Leukämie [631, 632], Arthritis [633, 634], Krebs [385, 635,

636] und HIV [386, 387], die möglicherweise mit einer Beteiligung von metabotropen Glutamatrezeptoren in Zusammenhang stehen könnten [637-640]. In T-Zellen scheinen millimolare Konzentrationen von Glutamat eine via mGluR5 verringerte Proliferation bzw. über mGluR1 und iGluRs eine erhöhte Zytokinsekretion zu bewirken, durch deren Interaktion eine Ausbreitung aktivierter Zellen zur Bekämpfung der Krankheit kontrolliert werden könnte [408].

Obwohl die meisten Studien den Einfluss von Glutamat bzw. dessen Rezeptoren auf T-Zellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersuchen, gibt es erste Hinweise über die Funktion der Aminosäure in Zusammenhang mit PMNs. So scheinen aktivierte Neutrophile Glutamat zu sekretieren und über mGluR1, 4 und 5 während Verletzungen bzw. Entzündungen die endotheliale Zellpermeabilität zu modulieren [420]. Dabei fungiert das freigesetzte Glutamat möglicherweise als Chemoattraktant für die Rekrutierung weiterer PMNs und neben der Induktion der Aktin-Zytoskelettpolarisierung die transendotheliale Neutrophilenmigration mit zu regulieren [418, 419]. Diese Annahme deckt sich mit den Ergebnissen einer kürzlich veröffentlichten Studie, die eine Glutamat-induzierte Glutamatfreisetzung für molekulare Signalübertragungen zwischen Neutrophilen und deren Verhaltensregulationen, bspw. dem ‚Swarming‘, identifizieren konnte [641].

In Bezug auf die Ergebnisse des cAMP-Lumineszenzassays scheint das Heterodimer mGluR2/TAS1R3 insbesondere bei niedrigen mikromolaren MSG-Konzentrationen von 1-10 μM zu einem signifikant potenteren Rezeptorkonstrukt im Vergleich zum mGluR2-Homodimer zu führen. Dieser Bereich steht in Einklang mit der optimalen Konzentration von 8 μM , die für PMNs ideale Bedingungen für die Chemotaxis und Zytoskelettpolarisierung bietet [419]. Zudem scheinen diese Glutamatniveaus in T-Zellen für ein verlängertes Überleben durch die Inhibition des AICD und gleichzeitig für die Zellproliferation mit verantwortlich zu sein [130]. Chemotaxis, Zellpolarisierungen und-proliferationen in Antwort auf exogene und endogene Stimuli sind Prozesse, die eine strenge Kontrolle und sensible Regulation bedürfen. Möglicherweise ist das Heterodimer bei diesen zellulären Vorgängen als sensibles Rezeptorkonstrukt mit für deren präzise Steuerung verantwortlich, um kleinste Änderungen der Glutamatkonzentrationen im Immunsystem wahrnehmen und regulieren zu können. Insbesondere im Darm steht das Immunsystem vor der Herausforderung, den Körper einerseits vor schädlichen Darmpathogenen zu schützen und gleichzeitig eine Überempfindlichkeitsreaktion auf hohe Glutamatkonzentrationen aus der Nahrung [642] und kommensalen Darmbakterien [643] zu verhindern [388, 644]. Ein möglicher Beitrag des Heterodimers ist in diesem Zusammenhang durchaus denkbar.

Grundsätzlich lässt sich die aus heterologen Zellen gewonnene Datenlage nicht spiegelbildlich auf endogene PMNs und T-Zellen übertragen. Gleichwohl sprechen die Ergebnisse aus der qPCR und den ELISAs für einen in Abhängigkeit von mikromolarem MSG bedingten Effekt in

Form einer erhöhten Genexpression von *GRM2* und *TAS1R3* sowie eines Anstiegs der fMLF-induzierten IL-8 Sekretion. Zudem berichteten *Gupta et al.* [418] von einer Sättigung der Bindung von Glutamat an Neutrophile bei 25 μ M, einer Konzentration, die den Beobachtungen aus dem cAMP-Lumineszenzassays entspricht. Jedoch muss ein potentieller Beitrag des Heterodimers an immunologischen Prozessen durch weitere Experimente untersucht werden, um dessen Funktion in Bezug auf Glutamat vollständig aufklären zu können.

Interessanterweise wies das murine mGluR2/TAS1R3-Ortholog im Vergleich zum humanen Rezeptor im cAMP-Lumineszenzassay keinen Heterodimer-spezifischen Funktionsgewinn in Form einer verbesserten Potenz auf. Stattdessen verliefen die Konzentrations-Wirkungskurven beider Dimere mGluR2 und mGluR2/TAS1R3 deckungsgleich mit nahezu identischen IC_{50} -Werten. Studien an Mäusen berichteten bereits in Bezug auf TAS1-Rezeptoren über deutliche Unterschiede zwischen Mensch und Maus hinsichtlich ihres Agonistenspektrums. Während der humane Umami-Rezeptor hauptsächlich und vorzugsweise L-Glutamat bindet, scheint das murine Orthologe auf eine Vielzahl von L-Aminosäuren zu antworten, von denen einige andere Geschmacksqualitäten als Umami, wie bspw. Süße, Säure und Bitterkeit hervorrufen [158, 160]. Im Gegensatz dazu scheint der murine Süßrezeptor TAS1R2/TAS1R3 nicht auf den synthetischen Süßstoff Cyclamat zu reagieren, während das humane Homologe eine deutliche Antwort über TAS1R3 zeigt [645, 646]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass sich Beobachtungen zum Verhalten von Geschmacksrezeptoren in humanen heterologen sowie endogenen Zellen nicht ohne weiteres auf ein Mausmodell für *in vivo* Studien übertragen lassen. Erschwerend kommt in Bezug auf Untersuchungen von Interaktionen der Geschmacksrezeptoren mit dem Immunsystem hinzu, dass sich murine und humane Neutrophile hinsichtlich ihrer Physiologie deutlich unterscheiden. Während PMNs beim Menschen etwa 50-70 % der Gesamtzahl an peripheren Blutleukozyten ausmachen, sind es bei der Maus lediglich 10-25 % [250]. Zudem unterscheiden sie sich in ihrer Größe und Morphologie, der Anzahl zirkulierender Zellen sowie der Expression von Chemokinrezeptoren [243, 250, 647, 648]. Humane PMNs wiesen in den ELISA-Experimenten eine in Antwort auf MSG vereinfachte fMLF-induzierte IL-8 Sekretion, möglicherweise unter Beteiligung von mGluR2/TAS1R3, auf. Die Tatsache, dass das potenteste menschliche PMN-anziehende Chemokin CXCL8 (IL-8) kein funktionelles Homolog in der Maus besitzt [243] und murine Neutrophile nur eine geringe Affinität gegenüber fMLF aufweisen [649], könnte für eine anderes intrazelluläres Signalling in Bezug auf MSG in murinen Neutrophilen sprechen. Unter Beachtung des ausbleibenden heterodimerspezifischen Effekts der murinen Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3 im cAMP-Lumineszenzassay sollte auch die Möglichkeit eines humanspezifischen Rezeptorheterodimers nicht vollständig ausgeschlossen werden. Jedoch bedarf es hierbei weiterer experimenteller Analysen bspw. unter Verwendung von siRNAs oder KO-Mäusen, um die speziesbedingten Unterschiede

hinsichtlich des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 zu verstehen und die jeweils zugrundeliegenden immunologischen Signalwege zusammen mit den interagierenden Signalproteinen vollständig aufklären zu können.

4.2.2 Substanz(en) aus dem Überstand von *Pseudomonas aeruginosa*

Dass sich das Agonistenspektrum des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 nicht alleine auf Mononatriumglutamat zu beschränken scheint, belegen die Ergebnisse des Überstände-Screenings aus insgesamt 14 unterschiedlichen bakteriellen Spezies. Mit einem reduzierten cAMP-Signal von 60-80 % im Vergleich zum korrespondierenden MOD-Medium weist der Überstand von *Pseudomonas aeruginosa* nicht nur eine eindeutige Rezeptorbindung, sondern vielmehr einen mit MSG vergleichbaren signifikanten Unterschied zwischen dem Homodimer mGluR2 und mGluR2/TAS1R3 auf, der die Annahme eines potenteren Rezeptorkonstrukts relativ zu mGluR2 unterstreicht.

P. aeruginosa ist ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, allgegenwärtiges Bakterium, das häufig in Böden [650, 651], Wasser [652], Pflanzen [650], Tieren [653] und Menschen [654] zu finden und in natürlichen sowie künstlichen Umgebungen wie Seen, Krankenhäusern und Abflussrohren verbreitet ist [655]. Als opportunistisches humanes Pathogen bildet es eine Hauptquelle für nosokomiale Infektionen [656] und ist für Lungeninflammationen und Sepsen in über 90 % aller immungeschwächten und Mukoviszidosepatienten verantwortlich, die als Hauptursache für hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten gelten [657-660]. Eine wesentliche Eigenschaft von *P. aeruginosa* ist dessen Fähigkeit zur Bildung von und Wachstum in Biofilmen, einer schleimigen Polymermatrix bestehend aus Polysacchariden, Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen [661, 662]. Einmal gebildet ist das Bakterium in diesen festhaftenden Populationen vor Immunreaktionen des Wirts geschützt und trotz Einsatz von Antibiotika nur schwer zu eliminieren [663, 664]. Für diese Persistenz nutzt das Pathogen unter anderem das Quorum Sensing (QS), eine Zell-Zell-Kommunikation, die durch eine Vielfalt an QS-Molekülen vermittelt wird und neben der Biofilm-Bildung dessen Adhäsion sowie die Zerstörung von Signalwegen des Wirtes durch zahlreiche Virulenzfaktoren reguliert [665]. Ihr Arsenal reicht von zellassozierten (Geißeln, Pili, Alginate und Lipopolysaccharid) bis hin zu extrazellulären (Proteasen, Zytotoxin, Pyocyanin, Siderophore, Exotoxinen und Exoenzymen) Virulenzfaktoren [660], deren Wirksamkeit Gewebeschäden, eine Blutstrominvasion und systemischen Verbreitung des Pathogens zur Folge hat [659]. Bei einer hohen Populationsdichte interagieren freigesetzte bakterielle QS-Signale mit ihren entsprechenden Rezeptoren, die downstream die Expression von über 300 für die Bildung von Virulenzfaktoren verantwortlichen Genen stimulieren [666, 667]. Dazu verfügt *P. aeruginosa* über drei Haupt-QS-Systeme, die abhängig und

unabhängig voneinander agieren und als hierarchisches Netzwerk den Crosstalk zwischen zellulären Signalen ermöglichen: das *Las*, *Rhl* und *Pqs* System (Abb. 4.3) [668].

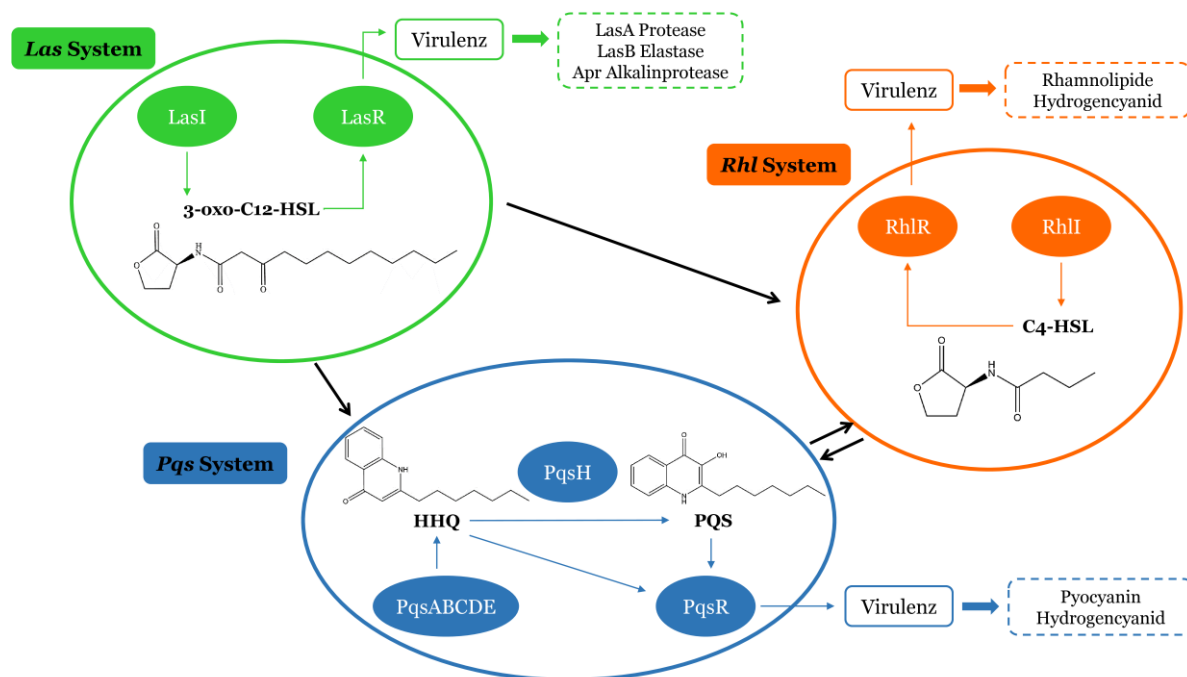


Abbildung 4.3: Die drei wesentlichen QS-Systeme von *Pseudomonas aeruginosa*. Das *Las* (grün), *Rhl* (orange) und *Pqs* (blau) System. Abbildung modifiziert nach Li et al. (2022) [668].

Das *Las* System steht an der Spitze der QS-Hierarchie und reguliert zusammen mit dem *Rhl*-System die Synthese und Signaltransduktion über zwei N-Acyl-Homoserin-Laktone (AHLs), 3-oxo-C12-HSL (Homoserin-Lakton) und C4-HSL. Diese QS-Moleküle werden jeweils von ihren Synthesen LasI bzw. RhlI gebildet und vermitteln über die DNA-bindenden Rezeptoren LasR und RhlR die transkriptionelle Regulation von Virulenzfaktoren [667-670]. Das *Pqs*-System nutzt hingegen mit HHQ und PQS zwei Moleküle aus der Familie der Alkylquinolonen, die in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten durch die Enzyme PqsA, B, C, D, E und H gebildet werden [667, 671]. Die Aktivierung des DNA-bindenden Transkriptionsregulator PqsR erfolgt unabhängig voneinander sowohl durch HHQ als auch durch PQS, wobei letzteres eine weitaus höhere Affinität für PqsR besitzt [667].

Neben ihrer zytotoxischen Wirksamkeit, die mit Gewebeschädigung einhergeht, weisen QS-Moleküle im nanomolaren bis mikromolaren Bereich eine Reihe von immunmodulatorischen Funktionen auf, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind.

Tabelle 4.1: Quorum sensing Moleküle von *P. aeruginosa* und ihre immunmodulatorischen Funktionen

QS-Molekül	Immunmodulatorische Funktion	Literatur
3-oxo-C12-HSL	Stimulation der IL-8 Produktion und Freisetzung aus humanen Epithelzellen	[672, 673]
	Stimulation der Chemotaxis und Phagozytose von Neutrophilen	[674, 675]
	Beschleunigung der Apoptose von Makrophagen, Neutrophilen und vaskulären Endothelzellen	[676, 677]
	Inhibition der Proliferation von PBMCs und IL-2-Sekretion	[659]
	Inhibition der T-Zellproliferation, Antigenpräsentation und Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen	[678, 679]
	Inhibition IL-12 und TNF- α Sekretion in LPS-stimulierten Makrophagen	[680]
Alkylquinolone	Stimulation der Chemotaxis von Neutrophilen	[662]
	Inhibition der Proliferation von PBMCs und IL-2-Sekretion	[659]
	Inhibition der Aktivierung von Makrophagen	[681]
	Induktion der Produktion von TNF- α in LPS-behandelten Monozyten	[659]
	Inhibition der IL-12 Produktion in dendritischen Zellen und folglich eine Reduktion der T-Zellproliferation	[682]

So modulieren die Virulenzdeterminanten für das Immunsystem essentielle Vorgänge wie Zytokinsekretionen, Zellproliferationen und Aktivierungsprozesse von Blutzellen, die zu weitreichenden Folgen für insbesondere immungeschwächte Personen führen können [683]. Die Anwesenheit weiterer QS-Signalmoleküle, unabhängig von den drei QS-Systemen, wie den zyklischen Dipeptiden Cyclo(Δ -Ala-L-Val) und Cyclo(L-Pro-L-Tyr) [534] oder der *cis*-2-Dezensäure [538] lässt zudem erahnen, dass es sich bei diesem Pathogen um ein Bakterium mit sehr komplexen Signalnetzwerken handelt, deren zusammenhängende Quorum Sensing Organisation, inklusive beitragender Signalmoleküle sowie deren Targets bzw. Rezeptoren im Wirtsorganismus bei weitem noch nicht vollständig verstanden sind [533]. Die in der vorliegenden Arbeit erbrachten Daten lieferten mit den Rezeptoren mGluR2 und TAS1R3 als auch dem gemeinsamen Heterodimer neue Ziele von *P. aeruginosa*. Die dafür verantwortliche(n) bakterielle(n) Substanz(en) sowie deren immunologische Funktionen müssen jedoch in weiterführenden Studien mittels HPLC und zellulären Assays identifiziert werden – das Screening der bekanntesten QS-Moleküle sowie Virulenzfaktoren, die bereits in Überständen von *P. aeruginosa* detektiert werden konnten [534, 538, 684] lieferte im cAMP-Lumineszenzassay keine heterodimer-spezifische Rezeptorantwort.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich bei mGluR2 und TAS1R3 im weitesten Sinne

um Glutamatrezeptoren bzw. Protomere handelt, liegt die Vermutung nahe, dass Glutamat im Überstand von *P. aeruginosa* selbst für das beobachtete Rezeptorsignal im cAMP-Lumineszenzassay verantwortlich sein könnte, zumal sich die Signalintensitäten zwischen Homodimer mGluR2 und dem Heterodimer ähnlich derer für MSG unterscheiden. Tatsächlich wiesen *Frimmersdorf et al.* [685] anhand einer Metabolomanalyse von *P. aeruginosa* Glutamat als wesentlichen Bestandteil in dessen Überstand nach. Jedoch scheint diese Aminosäure in anderen Pseudomonadenfiltraten wie dem von *P. fluorescens* und *P. striata* ebenfalls vorhanden zu sein [686], wie auch in Überständen des *Bacillus subtilis*, wo sie nachweislich zur Biofilmbildung und der Besiedlung von Pflanzenwurzeln beiträgt [687]. Die ausbleibende Rezeptorbindung der Überstände von *P. fluorescens* bzw. den *Bacillus* spp. im cAMP-Lumineszenzassay sprechen folglich gegen Glutamat als ursächlichen Auslöser der Rezeptorantwort von mGluR2/TAS1R3. Vielmehr scheint hierfür eine *P. aeruginosa*-spezifische Substanz, bspw. ein Virulenzfaktor verantwortlich zu sein, den es in weiteren Analysen zu identifizieren gilt. Gleichwohl könnte die Aminosäure in Bezug auf die bisher unbekannte Substanz von *P. aeruginosa* als auch in Zusammenhang mit bakteriellen Metaboliten anderer Spezies einen synergistischen Effekt auf das Heterodimer bewirken. Vor dem Hintergrund, dass bspw. Darmbakterien aber auch die oben genannten bakteriellen Vertreter einen relativ hohen Glutamatspiegel beinhalten [643] und der Existenz mehrerer potentieller allosterischer Bindungsstellen sowohl im TAS1R3- [542] als auch in Glutamatrezeptoren [11, 688], sollte eine mögliche Funktion bakterieller Metabolite als allosterische Modulatoren dieser GPCRs nicht ausgeschlossen werden. Experimentelle Analysen bspw. durch gleichzeitige Rezeptorstimulationen von MSG und bakteriellem Überstand könnten dazu dienen, diese Hypothese zu überprüfen.

4.3 Bakterielle Metabolite als potentielle Agonisten chemosensorischer GPCRs – Analyse, Potentiale und Ausblick

Bakterielle Metabolite spielen eine wesentliche Rolle für die menschliche Gesundheit [689]. Insbesondere das Mikrobiom des Darms liefert mit 100 Billionen Mikroorganismen und drei Millionen Genen, die für tausende Metabolite codieren, eine unvorstellbare Akkumulation diverser Stoffwechselprodukte. Dazu zählen Vitamine, Aminosäuren, Fettsäuren und viele bisher unbekannte Verbindungen, die gemeinsam die Physiologie, Fitness und den Phänotyp des Wirts beeinflussen [690, 691]. Viele der aus der Darmmikrobiota stammenden Metabolite dienen als Agonisten für verschiedenste humane GPCRs und es ist davon auszugehen, dass sich in den kommenden Jahren die Anzahl involvierter GPCRs und deren Interaktion mit bisher unbekanntem Metabolit-Agonisten noch deutlich erhöhen wird [691]. Die Identifizierung der QS-Moleküle PQS und *cis*-2-Dezensäure aus *P. aeruginosa* als potentielle Agonisten für den TAS1R3-Rezeptor bzw. die Beobachtung einer Rezeptorantwort von mGluR2 und mGluR2/TAS1R3 auf den Überstand dieses Bakteriums sind weitere Beispiele dafür, dass chemosensorische GPCRs weitaus mehr Funktionen im Körper einnehmen als bisher angenommen und vielmehr noch wesentliche Beiträge in Bezug auf das Immunsystem, dessen Regulation und der Interaktion mit mikrobiellen Metaboliten zu leisten scheinen.

Offensichtlich handelt es sich bei *P. aeruginosa* um einen Mikroorganismus, dessen QS-Moleküle die Fähigkeit besitzen, mit unterschiedlichen chemosensorischen GPCRs zu interagieren. Mehrere Studien berichten von Immunantworten gegenüber den spezifischen AHLs und Quinolonen in den Atemwegen bzw. auf Neutrophilen, die durch die Bitterrezeptoren TAS2R4, TAS2R14, TAS2R20, TAS2R38 und TAS2R138 vermittelt werden [530, 532, 692-695]. Die beobachteten Rezeptorantworten von mGluR2, TAS1R3 bzw. dem gemeinsamen Heterodimer auf Metabolite dieses Pathogens lassen erahnen, dass die bisherige Erkenntnis über die involvierten GPCRs vermutlich nur die Spitze des Eisbergs darstellen und die Immunantwort wohl über weitaus mehr beteiligte Rezeptoren erfolgt. Die Transkriptionsanalysen von *Malki et al.* [222] zusammen mit den qPCR-Daten aus der vorliegenden Arbeit [474] verdeutlichen, dass Blutleukozyten über ein enormes Repertoire unterschiedlicher chemosensorischer GPCRs verfügen, deren Funktion mit hoher Wahrscheinlichkeit mitunter in Reaktionen auf diese Art von Stoffwechselprodukten bzw. der gegenseitigen Regulation zur Kontrolle der Immunantwort liegen, wie es bereits für Bittergeschmacksrezeptoren und den Süßrezeptor in den oberen Atemwegen in Antwort auf bakterielle Infektionen gezeigt werden konnte [344]. Berichte über eine Interaktion des Süßrezeptors mit den von Staphylokokken sekretierten D-Aminosäuren D-Phenylalanin und D-Leucin in solitären chemosensorischen Zellen [345] bzw. der Detektion bakterieller Moleküle aus Streptokokken [523, 696] und *Bacillus cereus* [697] durch Bitterre-

zeptoren unterstreichen diese Annahme. Aber nicht nur Geschmacksrezeptoren scheinen unter den chemosensorischen GPCRs einen Einfluss auf die Physiologie zu nehmen. Mehrere Studien aus den vergangenen 10 Jahren berichten von einer Interaktion verschiedener Geruchsrezeptoren mit bakteriellen Metaboliten und einer damit einhergehenden Induktion von Mikroglia-Aktivierungen [698], der Renin-Sekretion und Blutdruckregulation [286] sowie einer erhöhten Sekretion des anorektischen Darmhormonpeptids YY [699].

Die Komplexität der Natur von GPCRs gerade in Bezug auf das Immunsystem zeigt sich ferner in deren Möglichkeit zur Bildung neuer, bisher unbekannter Rezeptoroligomere mit bisweilen nahezu völlig unerforschten Funktionen. Neben den in dieser Arbeit bereits erwähnten mGluR-Heterodimeren oder mGluR2/TAS1R3 scheinen beispielsweise auch Dimerisierungen zwischen GPCRs und T-Zellrezeptoren auf Immunzellen zu existieren [700] bzw. zwischen gleichen Protomeren, deren Vorhandensein insbesondere auf funktionaler Ebene für lange Zeit ungeachtet blieb. Ein Beispiel hierfür liefert TAS1R3. Als Rezeptor mit der höchsten Genexpressionsrate aller Geschmacks-, Geruchs- und metabotropen Glutamatrezeptoren auf Blutleukozyten [222, 474] werden diesem GPCR in sich häufenden Studien die Fähigkeit zur Homodimerisierung sowie Funktionen unabhängig von TAS1R1 bzw. TAS1R2 zugeschrieben. So wurde das Homodimer in Fibroblasten [701], parietalen Magentumorzellen [702], Geschmacksrezeptoren [159, 161] und auf Neutrophilen [222] beschrieben, wo es als Süß- bzw. $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -Rezeptor unter anderem mit der Magensäuresekretion, Chemotaxis von Neutrophilen und der homöostatischen Regulation von Büschelzellen im Darm assoziiert wird [222, 328, 451, 701-703]. Vielmehr noch scheint der TAS1R3-Rezeptor in Bezug auf bakterielle Metabolite einen wichtigen Beitrag für das Immunsystem zu leisten, indem er als Homodimer in solitären chemosensorischen Zellen der oberen Atemwege durch Detektion von D-Aminosäuren aus *S. aureus* zu einer erhöhten Aufnahme von Glukose und folglich zu einer Stärkung der innaten Immunität beitragen könnte [704].

Mit PQS und der *cis*-2-Dezensäure konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei weitere bakterielle Metabolite aus *P. aeruginosa* als potentielle Agonisten für TAS1R3 identifiziert werden. Jedoch bedarf es weiteren experimentellen Untersuchungen, um den Beitrag zusätzlicher Rezeptoren wie bspw. TAS1R1 oder TAS1R2 im Heterodimer ausschließen und letztlich von TAS1R3-spezifischen QS-Molekülen sprechen zu können. Die BRET-Experimente liefern durchaus Hinweise auf eine eindeutige physische Interaktion beider Rezeptorprotomere, die die Annahme der Fähigkeit von TAS1R3 zur Bildung von Homodimeren bekräftigt. Zudem muss in nachfolgenden Analysen die immunologische Funktion der QS-Moleküle auf Blutleukozyten ermittelt werden. Welche downstream Signalwege werden in Folge der Agonistenbindung aktiviert? Welche Chemokine bzw. Zytokine werden im Anschluss sekretiert? Wie verhält sich die Zelle in Antwort auf die jeweiligen Moleküle? Gibt es Unterschiede im Verhalten von

PMNs und T-Zellen? Reagiert TAS1R3 möglicherweise gemeinsam mit bereits identifizierten Bitterrezeptoren oder anderen GPCRs in agonistischer/antagonistischer Weise auf diese Substanzen? Für PQS ist bereits bekannt, dass es als Haupt-QS-Molekül eine Vielzahl an Funktionen einnimmt, darunter die Vermittlung von Zell-Zell-Signalen, die Expression von Virulenzfaktoren, die Anreicherung von Eisen sowie die Zytotoxizität und Immunsystemmodulation in Wirtszellen [669, 705]. Interessanterweise scheint jedoch sein unmittelbarer Vorläufer, das HHQ, dem im Vergleich zu PQS ausschließlich eine Hydroxyl-Gruppe fehlt, keine Rezeptorantwort in Bezug auf TAS1R3 zu zeigen. So wäre es nützlich, mit Hilfe von *in silico* Analysen die Bindungseigenschaften von PQS, insbesondere der OH-Gruppe, und TAS1R3 zu analysieren, um ein besseres Verständnis über die Interaktion von Agonist und Rezeptor zu erhalten.

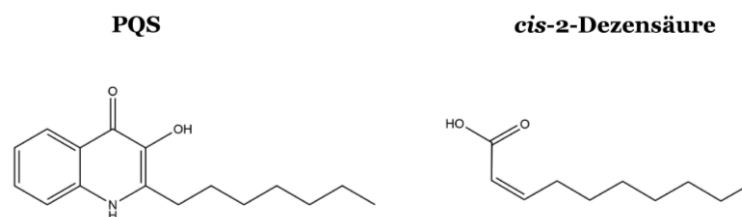


Abbildung 4.4: Strukturformeln von PQS und *cis*-2-Dezensäure, den potentiellen Agonisten von TAS1R3.

Ähnliches gilt für die *cis*-2-Dezensäure. Während basierend auf dem Kurvenverlauf der Konzentrations-Wirkungsbeziehung beider QS-Moleküle im cAMP-Lumineszenzassay davon auszugehen ist, dass es sich bei PQS eher um einen partiellen Agonisten für TAS1R3 zu handeln scheint, kann bei der ungesättigten Fettsäure von einem vollen Agonisten ausgegangen werden. Neben PQS weist auch diese Substanz eine Hydroxyl-Gruppe auf, die möglicherweise mit an einer TAS1R3-Rezeptorinteraktion beteiligt ist. Zudem besitzt die *cis*-2-Dezensäure eine ähnlich lange Kette an ungesättigten Kohlenstoffatomen, die eine weitere Ähnlichkeit mit PQS darstellt. *In silico* Analysen würden auch für diese Substanz eine gewinnbringende Methode bedeuten, um die Interaktion mit TAS1R3 auf molekularer Ebene nachvollziehen zu können. Gleichzeitig gilt es in weiterführenden Studien aufzuklären, ob neben der *cis*-2-Dezensäure weitere Fettsäuren bzw. QS-Moleküle anderer bakterieller Spezies als mögliche Agonisten für TAS1R3 fungieren könnten. So kontrolliert die *cis*-11-Methyl-Dodezensäure im nosokomialen Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* dessen Motilität, Virulenz und Biofilm-Bildung [706, 707]. Die gleichen Eigenschaften konnten für *Burkholderia cepacia* und dessen QS-Molekül, die *cis*-2-Dodezensäure, identifiziert werden [708-711]. Obwohl für die *cis*-2-Dezensäure aus *P. aeruginosa* sowohl ein Beitrag an der Biofilmbildung sowie die Eigenschaft der Dispersion etablierter *P. aeruginosa* Biofilme und Biofilme anderer Spezies nachgewiesen werden konnte, ist der genaue Funktionsmechanismus dieses QS-Moleküls sowohl für das Pathogen selbst, als auch in Bezug auf den Wirt noch nicht vollständig verstanden [533, 538]. Es bedarf

weiterer Studien, um diese diffusionsfähigen Signalfaktoren intensiver zu charakterisieren, um deren Fähigkeiten möglicherweise für die Entwicklung von Therapeutika oder biotechnologischer Prozesse zu nutzen. Als mögliche Einsatzbereiche der Biofilm-Dispersionsfähigkeit der *cis*-2-Dezensäure von *P. aeruginosa* wären beispielsweise kontaminierte Bioreaktoren oder mit Krankenhauskeimen infizierte Katheter bzw. biomedizinische Geräte denkbar.

Neue Anwendungsmöglichkeiten, insbesondere für die Lebensmittelindustrie und Lebensmittelkontrollen, liefert ebenso der im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Geosmin-Rezeptor OR11A1. Zahlreiche Schlechtgerüche wurden bereits in Nahrungsmitteln beschrieben [712-720], die sowohl die Produktqualität als auch die Verbraucherakzeptanz negativ beeinflussen [721]. Eine Möglichkeit, diese ungewünschten Gerüche zu detektieren und folglich gezielt dagegen vorzugehen, bieten elektronische Biosensoren, auch bioelektronische Nasen genannt – Geräte, die das menschliche Geruchssystem nachahmen [722]. Sie bestehen aus immobilisierten Geruchsrezeptoren an eine Support-Matrix, aufgebaut aus Graphen, Kohlenstoff-Nanoröhrchen oder Silizium-Nanodrähten. In Folge der Bindung von Zielanalyten (Geruchsmolekülen) an den entsprechenden Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und gleichzeitig zu einer elektrischen Signaltransduktion. Diese wird auf dem Sensor durch eine Änderung des Widerstands erkannt, welcher aus einem veränderten Ladungstransfer resultiert, der mit Konformationsänderungen einhergeht [723, 724]. *Goodwin et al.* [724] immobilisierten den humanen Geruchsrezeptor OR2AG1 an einen Graphenresistor und konnten auf diese Weise selektiv und sensitiv den Geruchsstoff Amylbutyrat detektieren. Einen anderen Ansatz verfolgten *Marrakchi et al.* [725], die anstelle einzelner Geruchsrezeptoren heterologe, den menschlichen OR3A1 (OR17-40) exprimierende *Saccharomyces cerevisiae* Zellen auf interdigitale Dünnschicht-Mikroelektroden immobilisierten und durch veränderte Leitfähigkeiten der Hefen eine Interaktion zwischen Geruchsstoffmolekül und Rezeptor detektieren konnten. Zudem berichten Studien über die Immobilisierung von Riechschleimhautgeweben [726] bzw. Riechrezeptorneuronen [727] zum Nachweis von Gerüchen auf Nanochips. In Hinblick auf Geosmin existieren bereits erste Entwicklungsansätze elektronischer Biosensoren, deren Anwendungsbereiche die Entwickler in erster Linie in der Überwachung von Wasserqualitäten und der Detektion von geosmin-produzierenden Algen sehen [728, 729].

Ein wesentlicher Aspekt, der die Entwicklung von spezifischen elektronischen Nasen und letztlich deren industrielle Anwendbarkeit jedoch bisher einschränkt, ist die Zuordnung von Geruchsrezeptoren zu ihren entsprechenden Agonisten. Bis heute konnten für nur etwa 15 % der funktionalen humanen Geruchsrezeptoren Liganden identifiziert werden [730]. Zudem werden mehr als 20 % der menschlichen ORs auch außerhalb des Geruchsgewebes in vielen Teilen des Körpers exprimiert, deren funktionales Spektrum eine wesentliche Aufgabe aktueller Forschung darstellt [731]. Der Einsatz von Hochdurchsatzmethoden zum Screening potentieller

Rezeptor-Geruchsstoff-Interaktionen sowie die stetige Entwicklung und Verbesserung von *in vitro* Assays, wie sie sowohl im Rahmen dieser Arbeit in Bezug auf die Geschmacksrezeptoren mGluR2 und TAS1R3 [474], als auch für die Ermittlung von Geosmin als Agonist für OR11A1 durchgeführt wurden [486], wird in den kommenden Jahren die Anzahl neuer Rezeptor-Agonist-Wirkungen deutlich erhöhen. Die daraus gewonnenen Datensätze gemeinsam mit Fortschritten in der Entwicklung von elektronischen Biosensoren könnten in naher Zukunft einen wesentlichen Beitrag bei der Verarbeitung und Qualitätskontrolle von Lebensmitteln und in Bereichen der Umweltanalytik hinsichtlich der Überprüfung von Wasser- oder Luftverschmutzungen leisten.

Das wachsende Verständnis über die biologische Relevanz der Interaktion von mikrobiellen bzw. (semio-)chemikalien-vermittelten Interaktionen mit Geruchsrezeptoren, wie im Falle von Geosmin, liefert zudem wesentliche neue Erkenntnisse über die Physiologie des Menschen sowie dessen Orthologen. Es ist bekannt, dass Geruchsrezeptoren als die sensitivsten, peripheren molekularen Sensoren für die Wahrnehmung und Erfassung umweltrelevanter Gerüche gelten [16, 485]. Transkriptionsstudien von *Sariva et al.* [485] zeigen, dass die Häufigkeit der Expression von Geruchsrezeptoren mit der Sensitivität gegenüber der Detektion umweltrelevanter Aromastoffe korreliert. Interessanterweise scheint der im Rahmen dieser Arbeit als Geosmin-Rezeptor identifizierte OR11A1, gemessen an seinen Transkriptniveaus, einer der am höchsten exprimierten ORs in der Riechschleimhaut des Menschen zu sein [732], was für seine möglicherweise bedeutende biologische Rolle als „Warnsensor“ gegenüber dem Verzehr von verdorbener Nahrung oder Trinkwasser in Folge von mikrobieller Besiedlung spricht. Gleichzeitig nimmt dieser Rezeptor bei der Känguru-Ratte unter Berücksichtigung deren Lebensstils und Ernährung mutmaßlich eine von Grund auf andere Funktion ein: Trockene Lebensräume wie sandige Böden oder Sanddünen [733, 734] sind charakteristische Habitate dieses Organismus, der sich hauptsächlich von Pflanzenmaterial ohne Zugang zu Trinkwasser zu ernähren scheint [735] und sich auf diesem Wege perfekt an seine Umgebung angepasst hat. Seine Nahrung beinhaltet unter anderem Kaktusfeigen und Kaktussamen [736, 737] – bekannte Geosminproduzenten, wie auch bodenbewohnende, sich von geosminproduzierenden Bakterien ernährende Arthropoden [733, 738], die zu 75 % Massenanteil aus Wasser bestehen [739], und in einer großen Dichte im Bau von Känguru-Ratten zu finden sind [740]. Dieser Lebensstil könnte eine mögliche Erklärung für doOR11A1 als Rezeptor mit dem geringsten EC₅₀-Wert und der besten Effizienz aller getesteten Orthologen gegenüber Geosmin [486] darstellen und zeigt einmal mehr die Komplexität und Vielfalt der GPCRs in Bezug auf deren Zusammenspiel mit umweltrelevanten Chemikalien und Metaboliten im Mensch- und Tierreich auf. Im Gegensatz zur Känguru-Ratte halten sich Orang-Utans hauptsächlich in Bäumen auf, wo sie sich in erster Linie von Früchten und Blättern ernähren [741]. Über ihre pflanzenreiche Ernährung und

Wasser aus Baumhöhlen decken sie einen Großteil ihres Wasserbedarfs ab [742] und sind aufgrund dieses Lebensstils vermutlich nicht auf geosmin-reiche Umgebungen angewiesen. Ähnliches könnte für den Menschen zutreffen. Diese Annahme steht im Einklang mit der im *in-vitro*-Assay beobachteten geringen chemorezeptiven Empfindlichkeit von OR11A1 beider Hominiden (Orang-Utan und Mensch) gegenüber Geosmin verglichen mit einer um mehrere Größenordnungen höheren Sensitivität der anderen getesteten OR11A1-Orthologe [486].

Interessanterweise zeigte der OR11A1-Rezeptor des Eisbären eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Geosmin wie das Rezeptorortholog der Maus, für die bereits die Fähigkeit zur Detektion von mit Schimmel assoziierten Geruchsstoffen (ohne Geosmin) im ng/L-Bereich zur Vermeidung von potenziell toxische Verbindungen in verfaulenden Nahrungsmitteln nachgewiesen wurde [743]. Sequenzanalysen von *Liu et al.* [744] identifizierten die OR-Genfamilie des Eisbären als Ziel positiver Selektion während der Evolution. So scheint eine schnelle ökologische Anpassung an die chemisch weniger komplexe arktische Umwelt mit einer Abnahme der Kopienzahl von OR-Genen im Eisbär einherzugehen, die mit einer spezifischen Entwicklung des Geruchssinns assoziiert zu sein scheint [745, 746]. Gleichzeitig besitzt der Eisbär unter den arktoiden Carnivoren und Caniden die größte bekannte Oberfläche des Riechepithels [747]. Dabei scheint die Riechkolbengröße mit der Ausdehnung des Verbreitungsgebiets von Raubtieren zu korrelieren [748]. Eine höhere Geruchssensitivität und -spezifität des Eisbären könnte seine ökologische Anpassung und das Aufspüren von Artgenossen oder Beute über größere Entfernungen hinweg widerspiegeln. Es ist bekannt, dass Eisbären weite Strecken schwimmen bzw. zurücklegen können [749]. Ein Geosmin-Gradient aus dem Boden, der durch Flüsse und Regenwasser in µg/L-Konzentrationen in den Ozean gespült wird [44, 750-752], könnte als Signal dienen, um an Land zu gelangen, wie es bereits für die Wanderung von Glas-aalen in Richtung Süßwasser angenommen wird [753]. Insgesamt weist die Identifizierung von isofunktionalen OR11A1-Rezeptor-Homologen in verschiedenen Spezies mit einer bis zu 100-fach höheren Empfindlichkeit für Geosmin im Vergleich zum menschlichen Rezeptor im Rahmen dieser Arbeit eindeutig auf die biologische Relevanz von Geosmin als Semiochemikalie hin. Diese Erkenntnis liefert die Grundlage für mögliche Anwendungen in Rezeptorbasierten Sensoren für Qualitätskontrollen von Lebensmittels oder als Instrument zur Überwachung von Wasserqualitäten in Süßwasserreservoirs.

Obgleich die Sammlung experimenteller Daten über spezifische Rezeptor-Agonist-Interaktionen, die Identifizierung neuer (bakterieller) Liganden für ektopisch exprimierte GPCRs oder den Nachweis möglicher heterodimerer Rezeptorkonstrukte für die Forschung nach wie vor eine ungemaine Aufgabe bedeutet, so bietet sie auch eine enorme und unglaubliche Gelegenheit, das Verständnis des komplexen funktionalen GPCR-Netzwerks im menschlichen Körper

voranzubringen und Stück für Stück aufzuklären. Das Potential, das jeder Rezeptor und jedes potentielle Heterodimer bietet, werden künftig dazu dienen, neurologische und autoimmune Erkrankungen sowie Krebs spezifisch behandeln zu können und auf diese Weise das Wohlbefinden vieler Patient:innen verbessern [439]. Bereits heute werden einige GPCR-Heterodimere mit neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht [553]. Das Wissen darüber, ist ein erster Schritt für die Entwicklung gezielter Therapeutika. Jedoch stehen Wissenschaftler:innen neben der Vielseitigkeit von GPCRs in Bezug auf ihre Agonisten, die sowohl exogene als auch endogene, körpereigene und körperfremde Substanzen und (bakterielle) Metabolite umfassen, vor dem Problem ihrer weit verbreiteten Gewebeexpression, die eine gezielte Behandlung ohne systemische Nebenwirkungen deutlich erschweren. Allosterische Interaktionen zwischen zwei GPCRs, wie *Liu et al.* [441] für mGluR2 und mGluR4 gezeigt haben, eröffnen die Möglichkeit mit Hilfe allosterischer Modulatoren gezielt die Aktivität dieser Rezeptoren zu steuern und auf diesem Weg präzise einzelne Signalvorgänge zu modulieren. Zudem könnten Subpopulationen von Blutzellen mit individuellen Expressionsmustern von GPCRs bzw. ihrer Signalproteine in der Zukunft dazu dienen, gezielte Therapieansätze zu entwickeln, um spezifisch Entzündungen bzw. Gewebeschäden zu behandeln, ohne das Immunsystem dabei gravierend zu schwächen. Insbesondere in den vergangenen 20-25 Jahren konnten auf dem Gebiet der GPCR-Forschung mit der Identifizierung von ektopisch exprimierten Rezeptoren und dem allmählich beginnenden Verständnis über den unglaublichen funktionellen Beitrag dieser Proteine im gesamten menschlichen Körper große Fortschritte erzielt werden, die enormes Potential für diverse Anwendungsbereiche der Medizin, Ernährungsforschung sowie biotechnologischer Verfahren bieten. Nicht zuletzt auf dem Gebiet der Rezeptorheterodimerisierung fand ein Paradigmenwechsel statt: Die Frage über eine Existenz von Heterodimeren ist der Frage gewichen, welchen Mechanismen bzw. physiologischen Abläufen bestimmte Rezeptor-Heteromere dienen – eine Fragestellung, die die Forschung in den kommenden Jahrzehnten stetig beschäftigen wird.

A.1 Oligonukleotide

Die aufgeführten Oligonukleotide und Sonden wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert, mittels HPLC aufgereinigt und in Reinstwasser (100 µM) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Oligonukleotide mit Abkürzungen „dk“ bzw. „ab“ wurden von Dr. Dietmar Krautwurst bzw. Dr. Agne Malki erstellt und zur Verfügung gestellt. Oligonukleotide, die aus einer Zahlenkombination bestehen, stammen von Julia Bauer.

Tabelle A.1: Oligonukleotidsequenzen für RT-qPCR

Gen	Oligo-nukleotid	T _M (°C)		Sequence 5' → 3'
GAPDH	dk-918a	58	fw	CAT GGG TGT GA ACCA TGA GA AGTA TGA C
	dk-919	58	rv	CAC GGA AGG CCA TGC CAG TGA GCT TC
ACTB	ab-270	58	fw	GCC AAC CGC GAG AAG ATG ACC
	ab-271	58	rv	CAG GTC CAG ACG CAG GAT GG
GRM1	ab-124	58	fw	GGA GGA AAA GCC TGG GAG TGG
	ab-125	58	rv	GGC TGT TCC TTG GCA AGC ATG G
GRM2	ab-126	58	fw	GGA GGG AGA CTT GGT GCT GG
	ab-127	58	rv	GGT GCG GGT CAC GGT TGA TG
GRM3	ab-128a	59	fw	GCG CTT CTT CAA CTG GAC CTA CG
	ab-129a	58	rv	GGA CTT GCG GAT GTT GGA GCG
GRM4	lb-027	58	fw	GCG CAA CGA TTC TGC CGA GTA C
	lb-028	58	rv	GTA CCC TGT GCA AGG CTC GC
GRM5	ab-132	58	fw	GGC GGT CCG TGA ACA GTA TGG
	ab-133	58	rv	GGC CCA ATG ACC CCT ACT ATG G
GRM6	ab-134a	58	fw	GGC GAT GGA ACC CAC TGA TGG
	ab-135a	58	rv	CCA GTC TGA GGG TCT CTG CC
GRM7	ab-136	58	fw	GCA CTC AAT CCG GAT CGA GGG
	ab-137	58	rv	GCG CCT GGA CGA AAG TAA GCG
GRM8	lb-029	58	fw	GAT CTC GAG GGA GAT TGG TGG TG
	lb-030	58	rv	CCT CCT GAT GTC ATC CTC ATT GGC
TAS1R1	ab-114	58	fw	GGT GGA CCT GGA TCT CTC TGG
	ab-115a	58	rv	GAG GCA CTG CAT CCT CTC ATC G
TAS1R2	ab-102	58	fw	GCT GGA ACT GGA TCA TTG TGC TGG
	ab-103	58	rv	GTG CTC TGC TGC AGC TTG TCC
TAS1R3	ab-106	58	fw	GGT GCT AGC ATG GAG CTG CTG
	ab-107	58	rv	GAG AAG ATG CTC AGG CCC TGC

T_M = Schmelztemperatur, fw = forward, rv = reverse. Größe der Amplikons: 150 – 308 bp

Tabelle A.2: Oligonukleotid- und Sondensequenzen für ddPCR

GRM2 Isoform (NCBI Referenzse- quenz)	T_M (°C)		Sequence 5' → 3'
Isoform 1 (NM_001349116.2)	58	fw	CGC TCC ACT CCG ATT CTC
	58	rv	CAG TCT CGC TGC CGG AA
	68	s	CGC GCC AGA GCC TGG ACC CT
Isoform 2 (NM_001349117.2)	58	fw	ACC TGA AAG TCT CCT GAA ATC
	58	rv	CAA GCT TTG TCT CCC ACT GT
	68	s	AGT GCC AGC TTT AAG AGA AAT GAC TGC
Isoform 3 (Alle Isoformen, darun- ter NM_000839.5)	58	fw	TCT GCT ACT GCA TGA CCT TCA
	58	rv	CAA TGC GGT TGG TCT TGG T
	68	s	CCA CGG CAG TGT GTA CCT TAC GG

T_M = Schmelztemperatur, *fw* = forward, *rv* = reverse. *s* = Sonde. Größe der Amplikons: 126 – 131 bp

Tabelle A.3: Vektorinterne Oligonukleotide

Vektor	Oligo- nukleotid	T_M (°C)		Sequenz 5' → 3'
pcDNA3.1 (Hygro +)	T7	56	fw	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
	bgh	58	rv	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
pFN210A	520	60	fw	GTG GAC ATC GGC CCG GGT C
	550	52	rv	CAC AAA TAA AGC ATT TTT TTC ACT GC
pI2-dk	dk-231	57	fw	GCA GAG CTG GTT TAG TGA ACC G
	dk-232a	59	rv	GCA AGT AAA ACC TCT ACA AAT GTG GTA TGG

T_M = Schmelztemperatur, *fw* = forward, *rv* = reverse

A.2 NCBI Referenzsequenzen

Tabelle A.4: NCBI Referenzsequenzen der für die qPCR, ddPCR bzw. Funktionsassays verwendeten Rezeptorgene

Gen	Spezies	NCBI Referenzsequenz (Accession number)
ACTB	<i>Homo sapiens</i>	NM_001101.5
GAPDH	<i>Homo sapiens</i>	NM_002046.7
<i>GRM1</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_001278064.2
<i>GRM2</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_000839.5
<i>Grm2</i>	<i>Mus musculus</i>	NM_001160353.1
<i>GRM3</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_000840.3
<i>GRM4</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_000841.4
<i>GRM5</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_001143831.3
<i>GRM6</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_000843.4
<i>GRM7</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_000844.4
<i>GRM8</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_001371086.1
<i>TAS1R1</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_138697.4
<i>TAS1R2</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_152232.5
<i>TAS1R3</i>	<i>Homo sapiens</i>	NM_152228.2
<i>Tas1r3</i>	<i>Mus musculus</i>	NM_031872.2
OR11A1	<i>Homo sapiens</i>	NM_001394828.1
OR11A1	<i>Dipodomys ordii</i>	XM_013031123.1

A.3 Sequenzen für IL-6, Halo-Tag® und rho-tag(39)

IL-6 (Nukleotidsequenz, 87 bp):

ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGCCTTCGGTCCAGTTGCCTTCTCCCTGGGTCTGCTCCTGGTGTTCCTGCTG
CCTTCCCTGCTCCG

IL-6 (Proteinsequenz, 29 AS):

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAP

Halo-Tag® (Nukleotidsequenz, 891 bp):

ATGGCAGAAATCGGTACTGGCTTTCCATTCGACCCCCATTATGTGGAAGTCCTGGGCGAGCGCATGCACTAC
GTCGATGTTGGTCCGCGCGATGGCACCCCTGTGCTGTTCCCTGCACGGTAACCCGACCTCCTCCTACGTGTGGC
GCAACATCATCCCGCATGTTGCACCGACCCATCGCTGCATTGCTCCAGACCTGATCGGTATGGGCAAATCCG
ACAAACCAGACCTGGGTTATTTCTTCGACGACCACGTCCGCTTCATGGATGCCTTCATCGAAGCCCTGGGTC
TGGAAGAGGTCGTCCTGGTCATTCACGACTGGGGCTCCGCTCTGGGTTTCCACTGGGCCAAGCGCAATCCAG
AGCGCGTCAAAGGTATTGCATTTATGGAGTTCATCCGCCCTATCCCGACCTGGGACGAATGGCCAGAATTTG
CCCGCGAGACCTTCCAGGCCTTCCGCACCACCGACGTCGGCCGCAAGCTGATCATCGATCAGAACGTTTTTAT
CGAGGGTACGCTGCCGATGGGTGTGCTCCGCCCGCTGACTGAAGTCGAGATGGACCATTACCGCGAGCCGTT
CCTGAATCCTGTTGACCGCGAGCCACTGTGGCGCTTCCCAAACGAGCTGCCAATCGCCGGTGAGCCAGCGAA
CATCGTCGCGCTGGTCGAAGAATACATGGACTGGCTGCACCAGTCCCCTGTCCCGAAGCTGCTGTTCTGGGG
CACCCCAGGCGTTCTGATCCCACCGGCCGAAGCCGCTCGCCTGGCCAAAAGCCTGCCTAACTGCAAGGCTGTG
GACATCGGCCCGGGTCTGAATCTGCTGCAAGAAGACAACCCGGACCTGATCGGCAGCGAGATCGCGCGCTGG
CTGTGACGCTCGAGATTTCCGGC

Halo-Tag® (Proteinsequenz, 297 AS):

MAEIGTGPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVFLHGNPTSSYVWRNIIPHVAPTHRCIAPDLIGMGKS
DKPDLGYFFDDHVRFMDFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNPBRVKGIAFMFIRPIPTWDEWPE
FARETFQAFRTTDVGRKLIIDQNVFIEGTLPMGVVRPLTEVEMDHYREPFLNPVDREPLWRFPNELPIAGEPA
NIVALVEEYMDWLHQSPVPKLLFWGTPGVLPAPAEARLAKSLPNCKAVDIGPGLNLLQEDNPDIGSEIARW
LSTLEISG

Rho-tag(39) (Nukleotidsequenz, 117 bp):

ATGAACGGGACCGAGGGCCCAAACCTTCTACGTGCCTTTCTCCAACAAGACGGGCGTGGTGCGCAGCCCC
TTCGAGGCCCCGAGTACTACCTGGCGGAGCCATGGCAGTTCTCCATG

Rho-tag(39) (Proteinsequenz, 39 AS):

MNGTEGPNFYVPFSNKTGVVRSFPFEAPQYYLAEPWQFSM

A.4 Expressionsvektoren

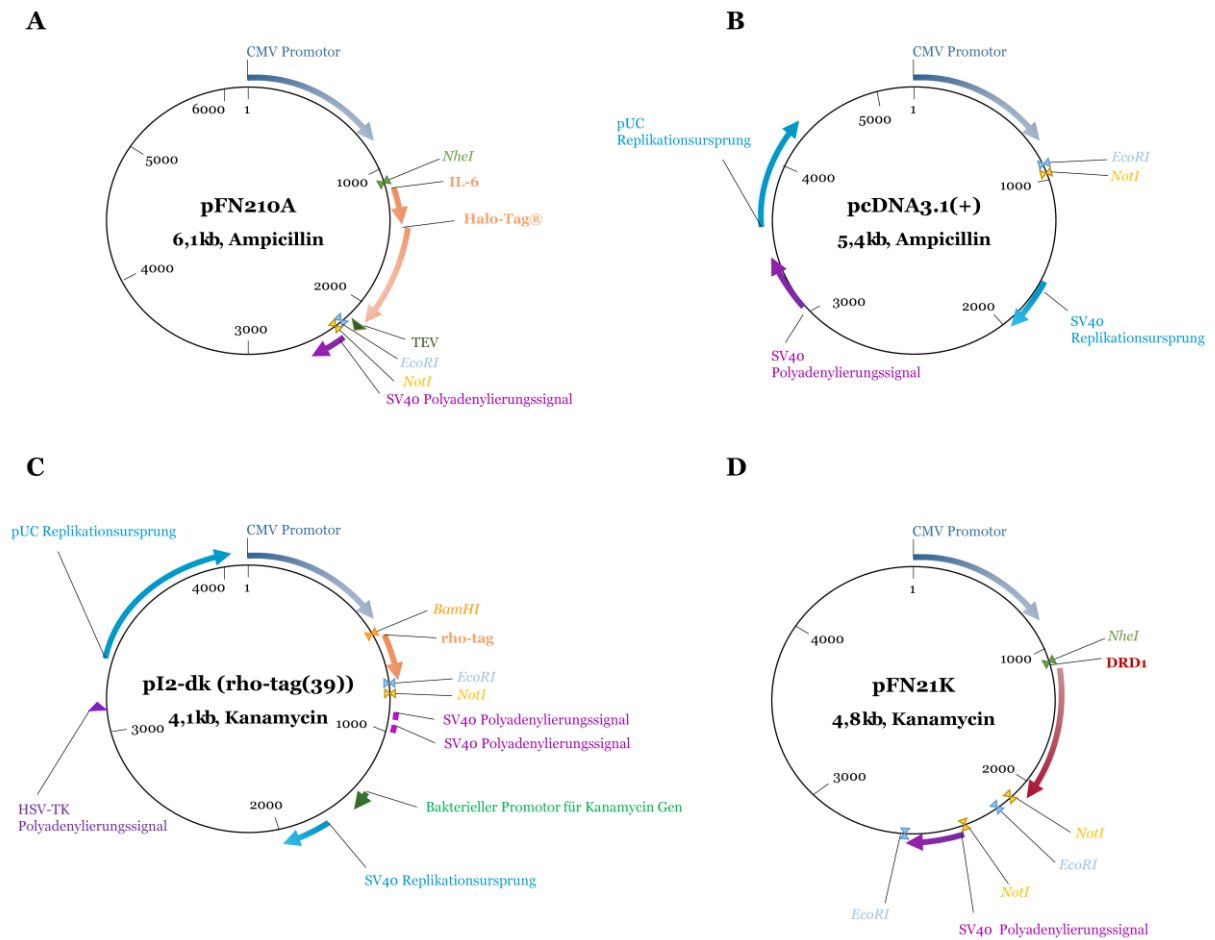


Abbildung A.1: Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide. Die Plasmide pFN210A (A), pcDNA 3.1(+) (B) und pI2-dk (rho-tag(39)) dienen zur Klonierung der jeweiligen Rezeptoren bzw. G-Proteine. pFN21K (D) wurde als Mock-Kontrolle in der Durchflusszytometrie verwendet. DRD1 = Dopaminrezeptor D1, TEV = TEV (Tobacco Etch Virus)-Protease Schnittstelle, HSV-TK = Herpes Simplex Virus – Thymidin Kinase

A.5 Ergänzungen zum Material- und Methodenteil

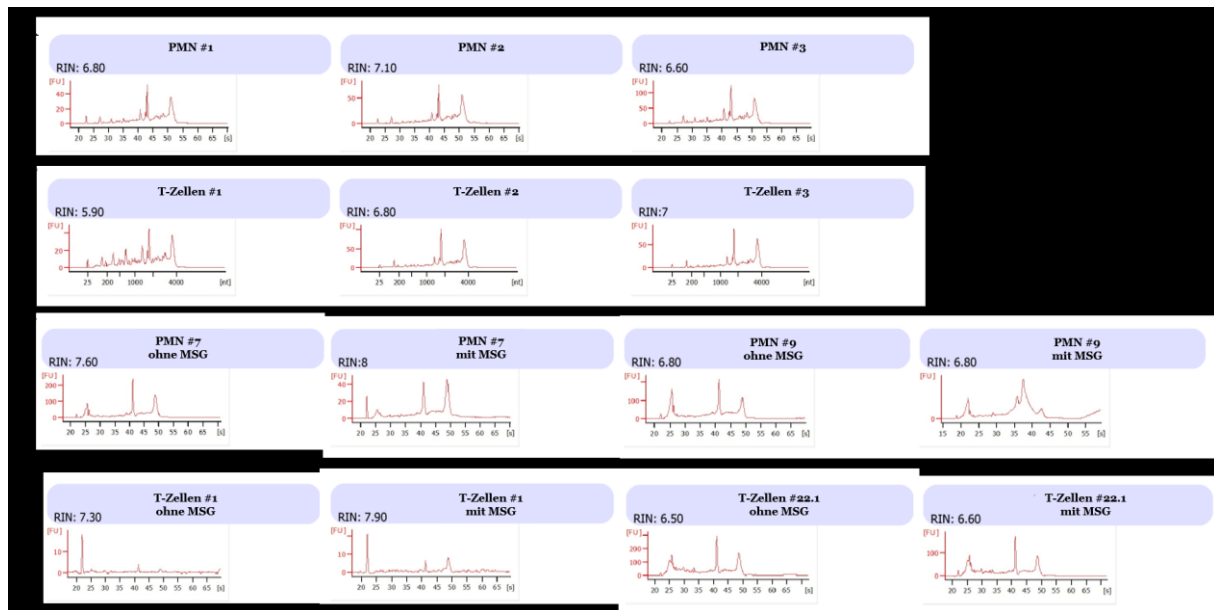


Abbildung A.2: Elektropherogramme der analysierten RNAs mit entsprechenden RIN-Werten. Stichpunktartige RNA-Qualitätsbestimmung isolierter RNAs aus PMNs (A), T-Zellen (B) sowie MSG-stimulierten PMNs (C) und T-Zellen (D).

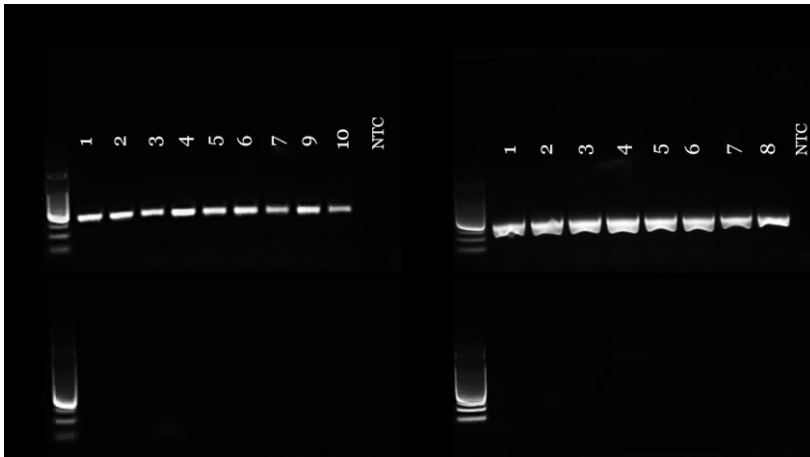


Abbildung A.3: Agarose Gelelektrophorese (0,7% Agarose Gel) von PCR-Produkten aus unstimulierten Blutzellen. Amplifikate wurden durch die durch Amplifikation des GAPDH-Gens aus cDNAs unstimulierter PMNs (A) und T-Zellen (B) bzw. derer Negativkontrollen (-RT) (jeweils untere Zeile) erhalten. NTC = No template control (PCR ohne cDNA-Template). Größe der PCR-Amplikons: 308 bp.

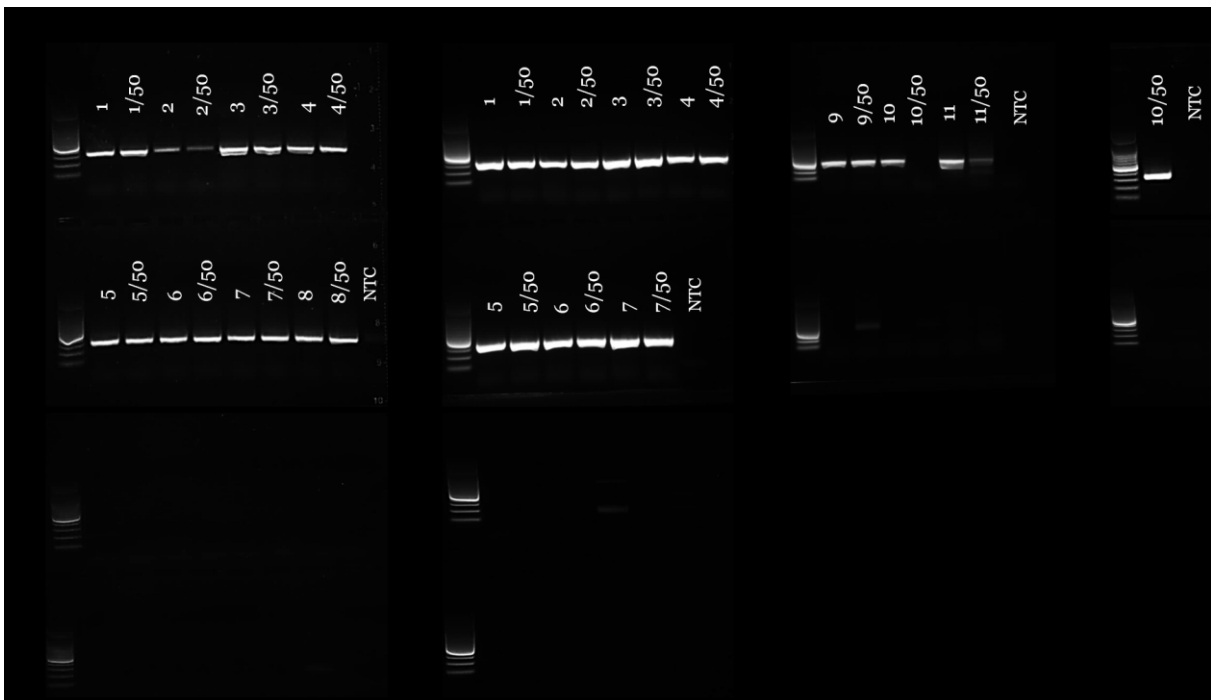


Abbildung A.4: Agarose Gelelektrophorese (0,7% Agarose Gel) von PCR-Produkten aus stimulierten Blutzellen. Amplifikate wurden durch Amplifikation des GAPDH-Gens aus cDNAs von PMNs (A) und T-Zellen (B-D) bzw. derer Negativkontrollen (-RT) (jeweils untere Zeile) erhalten. Die Zahl 50 steht hier für die Stimulation mit 50 μ M MSG. NTC = No template control (PCR ohne cDNA-Template). Größe der PCR-Amplikons: 308 bp.

A.6 Ergänzungen zum Ergebnisteil – Kapitel 4.1: Geosmin als Beispiel eines bakteriellen Metabolits und Geruchsstoffs aktiviert *in vitro* den Geruchsrezeptor OR11A1

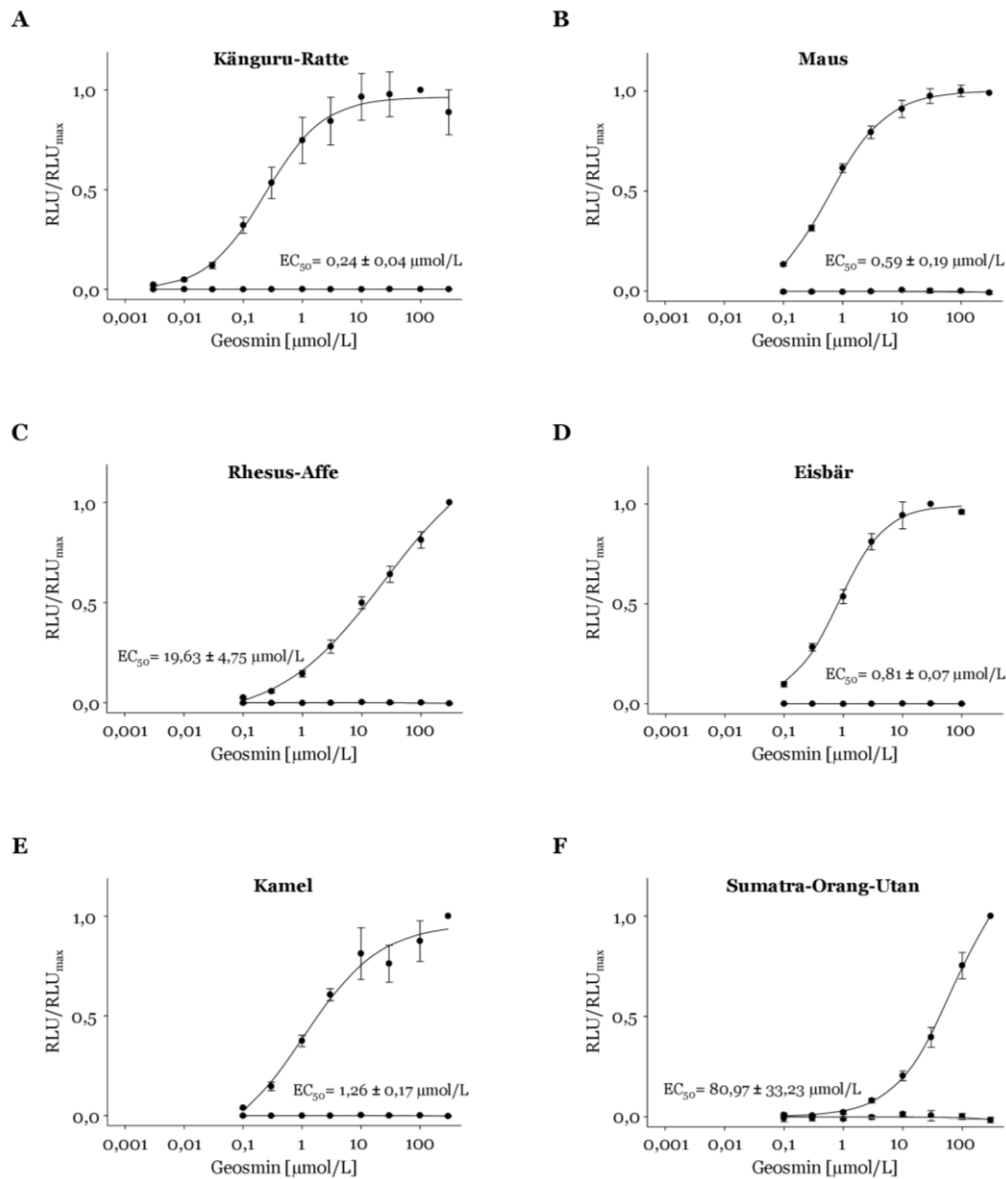


Abbildung A.5: Konzentrationsabhängige Antwort von OR11A1-Orthologen auf Geosmin. Konzentrations-Wirkungskurven von OR11A1-Orthologen bzw. mock und Geosmin mit den jeweiligen EC_{50} -Werten. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus $n=3-4$ unabhängigen Messungen normalisiert auf die jeweils höchste Rezeptorantwort. Die Daten stammen von Tim Frey (LSB) [486].

A.7 Ergänzungen zum Ergebnisteil – Kapitel 4.4: Funktionsanalyse des Heterodimers mGluR2/TAS1R3 in PMNs

Tabelle A.5: EC_{50} -Werte von *fMLF* in behandelten und unbehandelten PMNs [474].

Behandlung	EC_{50} -Werte
Unbehandelt	2.38 ± 1.09
MSG	2.15 ± 1.11
mGluR2 Antagonist 1	1.19 ± 0.28
Lactisol	2.10 ± 1.13
mGluR2 Antagonist 1 + Lactisol	1.34 ± 0.26

Gezeigt sind die Werte als Mittelwert \pm Standardabweichung von $n=6-13$ verschiedenen Blutproben in $\mu\text{mol/L}$.

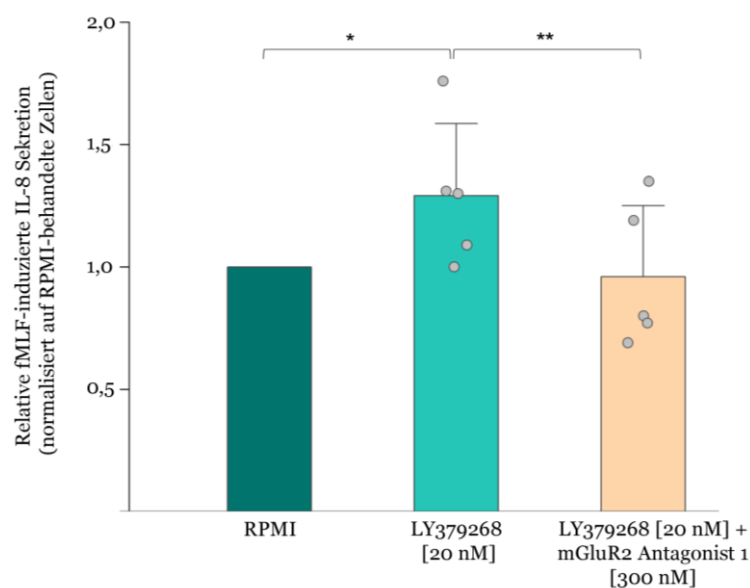


Abbildung A.6: Der mGluR2-spezifische Agonist LY379268 vereinfacht die *fMLF* (3 nM)-induzierte IL-8-Sekretion, die durch den mGluR2-Antagonisten 1 gehemmt wird. Vierstündige *fMLF*-induzierte (3 nM) IL-8-Sekretion in isolierten PMNs nach zweistündiger Vorstimulation mit dem mGluR2-spezifischen Agonisten LY379268 (20 nM) in An- bzw. Abwesenheit des mGluR2-spezifischen Antagonisten 1. Änderungen der IL-8-Konzentration sind normalisiert auf RPMI-behandelte Proben ohne LY379268 („RPMI“). Die Daten sind der Mittelwert \pm SEM ($n=5$). Die Signifikanz der Unterschiede wurde mit einem einseitigen *t*-Test geprüft: (**) $p \leq 0,01$; (*) $p \leq 0,05$. Abbildung modifiziert nach Ball et al. (2023) [474].

-
- [1] R. Fredriksson et al., The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints, *Mol Pharmacol*, 63, 1256-1272, 2003.
- [2] W. I. Weis & B. K. Kobilka, The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation, *Annu Rev Biochem*, 87, 897-919, 2018.
- [3] D. Yang et al., G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery, *Signal Transduct Target Ther*, 6, 7, 2021.
- [4] P. A. Insel et al., GPCRomics: An Approach to Discover GPCR Drug Targets, *Trends Pharmacol Sci*, 40, 378-387, 2019.
- [5] T. Klabunde & G. Hessler, Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors, *Chembiochem*, 3, 928-944, 2002.
- [6] A. J. Venkatakrishnan et al., Molecular signatures of G-protein-coupled receptors, *Nature*, 494, 185-194, 2013.
- [7] K. J. Culhane et al., Transmembrane signal transduction by peptide hormones via family B G protein-coupled receptors, *Front Pharmacol*, 6, 264, 2015.
- [8] A. Gavalas et al., Segregation of family A G protein-coupled receptor protomers in the plasma membrane, *Mol Pharmacol*, 84, 346-352, 2013.
- [9] X. Qu et al., Chapter 1 - Progress in GPCR structure determination, In *GPCRs* (Jastrzebska, B., and Park, P. S. H., Eds.), pp 3-22, Academic Press, 2020.
- [10] D. Massotte & B. Kieffer, Structure—Function Relationships in G Protein-Coupled Receptors, In *The G Protein-Coupled Receptors Handbook*, pp 3-31, 2005.
- [11] H. Wu et al., Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator, *Science*, 344, 58-64, 2014.
- [12] F. Wu et al., Structure and Function of Peptide-Binding G Protein-Coupled Receptors, *J Mol Biol*, 429, 2726-2745, 2017.
- [13] M. F. Bear et al., Die chemischen Sinne, In *Neurowissenschaften*, pp 277-308, 2018.
- [14] K. McCrickerd & C. G. Forde, Sensory influences on food intake control: moving beyond palatability, *Obes Rev*, 17, 18-29, 2016.

- [15] H. Belitz et al., Aromastoffe, In *Lebensmittelchemie*, pp 346-411, Springer-Lehrbuch, Springer, Berlin, Heidelberg, 2008.
- [16] A. Dunkel et al., Nature's chemical signatures in human olfaction: a foodborne perspective for future biotechnology, *Angew Chem Int Ed Engl*, 53, 7124-7143, 2014.
- [17] H. Maarse et al., Volatile compounds in food: qualitative and quantitative data, *NO-CIVO Food Analysis Institute*, 1989.
- [18] A. Mithöfer & W. Boland, Do you speak chemistry? Small chemical compounds represent the evolutionary oldest form of communication between organisms, *EMBO Rep*, 17, 626-629, 2016.
- [19] M. Wüst, Smell of Stress: Identification of Induced Biochemical Pathways Affecting the Volatile Composition and Flavor Quality of Crops, *J Agric Food Chem*, 66, 3616-3618, 2018.
- [20] (OIV) International Organisation of Vine and Wine, Annual Assessment of the world vine and wine sector in 2021 https://www.oiv.int/sites/default/files/documents/OIV_Annual_Assessment_of_the_World_Vine_and_Wine_Sector_in_2021.pdf, 03-04-2024.
- [21] P. Winterhalter et al., Volatile C₁₃-Norisoprenoid Compounds in Riesling Wine Are Generated From Multiple Precursors, *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 277-283, 1990.
- [22] M. M. Mendes-Pinto, Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma, *Arch Biochem Biophys*, 483, 236-245, 2009.
- [23] P. Winterhalter & R. Gök, TDN and β -Damascenone: Two Important Carotenoid Metabolites in Wine, In *Carotenoid Cleavage Products*, pp 125-137, 2013.
- [24] R.F. Simpson, 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene: an important contributor to the bottle aged bouquet of wine, 37, 1978.
- [25] J. Marais, The Significance of 1,1,6-Trimethyl-1,2- Dihydronaphthalene in the Production of High Quality Riesling Wines, In *Carotenoid-Derived Aroma Compounds*, pp 273-284, 2001.
- [26] C. Black et al., Aged Riesling and the development of TDN, *Wine Vitic. J*, 27, 20-26, 2012.
- [27] K. E. Murray et al., The chemistry of food flavour. I. Volatile constituents of passionfruit, *Passiflora edulis*, *Australian Journal of Chemistry*, 25, 1972.

- [28] T. R. Kemp et al., Aromatic hydrocarbons: Examination of peach fruit and foliage volatiles, *Phytochemistry*, 10, 478-479, 1971.
- [29] L. P. Stoltz et al., 1,2-Dihydro-1,1,6-trimethylnaphthalene from strawberry oil, *Phytochemistry*, 9, 1157-1158, 1970.
- [30] F. Haag et al., Petrol Note in Riesling - 1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene (TDN) Selectively Activates Human Odorant Receptor OR8H1, *J Agric Food Chem*, 72, 4888-4896, 2024.
- [31] V. Coca-Ruiz et al., Structures, Occurrences and Biosynthesis of 11,12,13-Tri-nor-Sesquiterpenes, an Intriguing Class of Bioactive Metabolites, *Plants (Basel)*, 11, 2022.
- [32] N. N. Gerber & H. A. Lechevalier, Geosmin, an earthy-smelling substance isolated from actinomycetes, *Appl Microbiol*, 13, 935-938, 1965.
- [33] R. Bentley, The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor, *Chem Rev*, 106, 4099-4112, 2006.
- [34] C. Gupta et al., A Biotechnological Approach to Microbial Based Perfumes and Flavours, *Journal of Microbiology & Experimentation*, 2, 2015.
- [35] R. G. Buttery et al., Geosmin, a musty off-flavor of dry beans, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 419-420, 1976.
- [36] C. Porcelli et al., Molecular Background of a Moldy-Musty Off-Flavor in Cocoa, *J Agric Food Chem*, 69, 4501-4508, 2021.
- [37] P. C. Lindholm-Lehto & J. Vielma, Controlling of geosmin and 2-methylisoborneol induced off-flavours in recirculating aquaculture system farmed fish—A review, *Aquaculture Research*, 50, 9-28, 2018.
- [38] L. L. Tian et al., An Effective and Efficient Sample Preparation Method for 2-Methyl-Isoborneol and Geosmin in Fish and Their Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Int J Anal Chem*, 2021, 9980212, 2021.
- [39] M. E. Abd El-Hack et al., Undesirable odour substances (geosmin and 2-methylisoborneol) in water environment: Sources, impacts and removal strategies, *Mar Pollut Bull*, 178, 113579, 2022.
- [40] S. B. Watson et al., Quantitative analysis of trace levels of geosmin and MIB in source and drinking water using headspace SPME, *Water Research*, 34, 2818-2828, 2000.
- [41] F. Jüttner & S. B. Watson, Biochemical and ecological control of geosmin and 2-methylisoborneol in source waters, *Appl Environ Microbiol*, 73, 4395-4406, 2007.

- [42] C. R. Dunlap et al., A Costly Endeavor: Addressing Algae Problems in a Water Supply, *Journal - American Water Works Association*, 107, E255-E262, 2015.
- [43] S. Mustapha et al., A critical review on geosmin and 2-methylisoborneol in water: sources, effects, detection, and removal techniques, *Environ Monit Assess*, 193, 204, 2021.
- [44] E. Asquith et al., Distribution, abundance and activity of geosmin and 2-methylisoborneol-producing *Streptomyces* in drinking water reservoirs, *Water Res*, 145, 30-38, 2018.
- [45] M. Behr et al., Earthy and Fresh Mushroom Off-Flavors in Wine: Optimized Remedial Treatments, *American Journal of Enology and Viticulture*, 64, 545-549, 2013.
- [46] P. Darriet et al., Identification and quantification of geosmin, an earthy odorant contaminating wines, *J Agric Food Chem*, 48, 4835-4838, 2000.
- [47] S. La Guerche et al., Origin of (-)-geosmin on grapes: on the complementary action of two fungi, *botrytis cinerea* and *penicillium expansum*, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88, 131-139, 2005.
- [48] H. Morales-Valle et al., Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry for improved analysis of geosmin and other fungal "off" volatiles in grape juice, *J Microbiol Methods*, 83, 48-52, 2010.
- [49] C. Churro et al., A novel cyanobacterial geosmin producer, revising GeoA distribution and dispersion patterns in Bacteria, *Scientific Reports*, 10, 8679, 2020.
- [50] K. K. Schrader & S. T. Summerfelt, Distribution of Off-Flavor Compounds and Isolation of Geosmin-Producing Bacteria in a Series of Water Recirculating Systems for Rainbow Trout Culture, *North American Journal of Aquaculture*, 72, 1-9, 2010.
- [51] B. Zaitlin & S. B. Watson, Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths, *Water Res*, 40, 1741-1753, 2006.
- [52] B. Gust et al., PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 1541-1546, 2003.
- [53] J. P. Mattheis & R. G. Roberts, Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*, *Appl Environ Microbiol*, 58, 3170-3172, 1992.
- [54] N. Bacha et al., Development of a novel quantitative PCR assay as a measurement for the presence of geosmin-producing fungi, *J Appl Microbiol*, 118, 1144-1151, 2015.

- [55] G. Izaguirre et al., Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems, *Appl Environ Microbiol*, 43, 708-714, 1982.
- [56] B. Pattanaik & P. Lindberg, Terpenoids and their biosynthesis in cyanobacteria, *Life (Basel)*, 5, 269-293, 2015.
- [57] J. S. Dickschat et al., A novel type of geosmin biosynthesis in myxobacteria, *J Org Chem*, 70, 5174-5182, 2005.
- [58] V. Gaget et al., Benthic cyanobacteria: A utility-centred field study, *Harmful Algae*, 113, 102185, 2022.
- [59] J. Chambers et al., Comparative Genomics and Pan-Genomics of the Myxococcaceae, including a Description of Five Novel Species: *Myxococcus eversor* sp. nov., *Myxococcus llanfairpwllgwyngyllgogerychwyrndrobwllllantysiliogogochensis* sp. nov., *Myxococcus vastator* sp. nov., *Pyxidicoccus caerfyrddinensis* sp. nov., and *Pyxidicoccus trucidator* sp. nov., *Genome Biol Evol*, 12, 2289-2302, 2020.
- [60] G. Lu et al., Biosynthetic origin of geosmin in red beets (*Beta vulgaris* L.), *J Agric Food Chem*, 51, 1026-1029, 2003.
- [61] B. O. Schlumpberger et al., Musty-Earthy Scent in Cactus Flowers: Characteristics of Floral Scent Production in Dehydrogeosmin-Producing Cacti, *International Journal of Plant Sciences*, 165, 1007-1015, 2004.
- [62] J. Jiang et al., Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme, *Nat Chem Biol*, 3, 711-715, 2007.
- [63] S. Hayashi et al., Identification of geosmin biosynthetic gene in geosmin-producing colonial cyanobacteria *Coelosphaerium* sp. and isolation of geosmin non-producing *Coelosphaerium* sp. from brackish Lake Shinji in Japan, *Harmful Algae*, 84, 19-26, 2019.
- [64] L. Martin-Sanchez et al., Phylogenomic analyses and distribution of terpene synthases among *Streptomyces*, *Beilstein J Org Chem*, 15, 1181-1193, 2019.
- [65] Z. Wang et al., The diversity, origin, and evolutionary analysis of geosmin synthase gene in cyanobacteria, *Sci Total Environ*, 689, 789-796, 2019.
- [66] H. Xu & J. S. Dickschat, A Detailed View on Geosmin Biosynthesis, *Chembiochem*, 24, e202300101, 2023.
- [67] M. M. Elmassry et al., Sixty-One Volatiles Have Phylogenetic Signals Across Bacterial Domain and Fungal Kingdom, *Front Microbiol*, 11, 557253, 2020.

- [68] P. Garbeva et al., Volatile sensation: The chemical ecology of the earthy odorant geosmin, *Environ Microbiol*, 25, 1565-1574, 2023.
- [69] N. Melo et al., Geosmin Attracts *Aedes aegypti* Mosquitoes to Oviposition Sites, *Curr Biol*, 30, 127-134 e125, 2020.
- [70] M. Wood et al., African elephants can detect water from natural and artificial sources via olfactory cues, *Anim Cogn*, 25, 53-61, 2022.
- [71] T. Teodoro-Morrison et al., Animal olfactory detection of disease: promises and pitfalls, *Clin Chem*, 60, 1473-1479, 2014.
- [72] M. C. Stensmyr et al., A conserved dedicated olfactory circuit for detecting harmful microbes in *Drosophila*, *Cell*, 151, 1345-1357, 2012.
- [73] L. Zaroubi et al., The Ubiquitous Soil Terpene Geosmin Acts as a Warning Chemical, *Appl Environ Microbiol*, 88, e0009322, 2022.
- [74] J. W. Rohen, *Funktionelle Neuroanatomie: Lehrbuch und Atlas*, Schattauer Verlag, 2001.
- [75] H. Hatt, Geschmack und Geruch, In *Physiologie des Menschen*, pp 386-400, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010.
- [76] C. L. Beites et al., Identification and molecular regulation of neural stem cells in the olfactory epithelium, *Exp Cell Res*, 306, 309-316, 2005.
- [77] J. Freiherr & M. Wiesmann, Das olfaktorische System des Menschen, *Der Nervenarzt*, 77, 931-939, 2006.
- [78] C. Moon et al., Smell, In *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, pp 216-220, 2014.
- [79] M. S. Xydakis et al., Post-viral effects of COVID-19 in the olfactory system and their implications, *Lancet Neurol*, 20, 753-761, 2021.
- [80] U. B. Kaupp, Olfactory signalling in vertebrates and insects: differences and commonalities, *Nat Rev Neurosci*, 11, 188-200, 2010.
- [81] B. Borowsky et al., Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 8966-8971, 2001.
- [82] S. D. Liberles & L. B. Buck, A second class of chemosensory receptors in the olfactory epithelium, *Nature*, 442, 645-650, 2006.

- [83] C. Dulac & R. Axel, A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals, *Cell*, 83, 195-206, 1995.
- [84] T. Leinders-Zufall et al., Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons, *Nature*, 405, 792-796, 2000.
- [85] N. J. Ryba & R. Tirindelli, A new multigene family of putative pheromone receptors, *Neuron*, 19, 371-379, 1997.
- [86] H. Matsunami & L. B. Buck, A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals, *Cell*, 90, 775-784, 1997.
- [87] G. Herrada & C. Dulac, A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution, *Cell*, 90, 763-773, 1997.
- [88] P. Hohenbrink et al., First evidence for functional vomeronasal 2 receptor genes in primates, *Biol Lett*, 9, 20121006, 2013.
- [89] T. Leinders-Zufall et al., MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ, *Science*, 306, 1033-1037, 2004.
- [90] N. Prevete et al., Role(s) of formyl-peptide receptors expressed in nasal epithelial cells, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 25, 553-564, 2011.
- [91] S. Riviere et al., Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors, *Nature*, 459, 574-577, 2009.
- [92] Y. Niimura & M. Nei, Evolution of olfactory receptor genes in the human genome, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12235-12240, 2003.
- [93] L. Buck & R. Axel, A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition, *Cell*, 65, 175-187, 1991.
- [94] B. Malnic et al., The human olfactory receptor gene family, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2584-2589, 2004.
- [95] G. Glusman et al., The complete human olfactory subgenome, *Genome Res*, 11, 685-702, 2001.
- [96] W. Grosch, Evaluation of the key odorants of foods by dilution experiments, aroma models and omission, *Chem Senses*, 26, 533-545, 2001.
- [97] B. Malnic et al., Combinatorial receptor codes for odors, *Cell*, 96, 713-723, 1999.

- [98] J. Freitag et al., Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates, *J Comp Physiol A*, 183, 635-650, 1998.
- [99] S. Hayden et al., Ecological adaptation determines functional mammalian olfactory subgenomes, *Genome Res*, 20, 1-9, 2010.
- [100] D. T. Jones & R. R. Reed, Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction, *Science*, 244, 790-795, 1989.
- [101] E. Shirokova et al., Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants, *J Biol Chem*, 280, 11807-11815, 2005.
- [102] R. R. Reed, Signaling pathways in odorant detection, *Neuron*, 8, 205-209, 1992.
- [103] P. B. Sklar et al., The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants, *Journal of Biological Chemistry*, 261, 15538-15543, 1986.
- [104] S. T. Wong et al., Disruption of the type III adenylyl cyclase gene leads to peripheral and behavioral anosmia in transgenic mice, *Neuron*, 27, 487-497, 2000.
- [105] T. Nakamura & G. H. Gold, A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia, *Nature*, 325, 442-444, 1987.
- [106] L. J. Brunet et al., General anosmia caused by a targeted disruption of the mouse olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel, *Neuron*, 17, 681-693, 1996.
- [107] T. Leinders-Zufall et al., Calcium entry through cyclic nucleotide-gated channels in individual cilia of olfactory receptor cells: spatiotemporal dynamics, *J Neurosci*, 17, 4136-4148, 1997.
- [108] S. Frings et al., Profoundly different calcium permeation and blockage determine the specific function of distinct cyclic nucleotide-gated channels, *Neuron*, 15, 169-179, 1995.
- [109] G. Lowe & G. H. Gold, Nonlinear amplification by calcium-dependent chloride channels in olfactory receptor cells, *Nature*, 366, 283-286, 1993.
- [110] D. Reuter et al., A depolarizing chloride current contributes to chemolectrical transduction in olfactory sensory neurons in situ, *J Neurosci*, 18, 6623-6630, 1998.
- [111] T. Kurahashi & K. W. Yau, Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells, *Nature*, 363, 71-74, 1993.

- [112] F. Zufall & S. D. Munger, From odor and pheromone transduction to the organization of the sense of smell, *Trends Neurosci*, 24, 191-193, 2001.
- [113] S. Firestein, How the olfactory system makes sense of scents, *Nature*, 413, 211-218, 2001.
- [114] C. M. Niswender & P. J. Conn, Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 50, 295-322, 2010.
- [115] J. Bockaert & J. P. Pin, Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success, *EMBO J*, 18, 1723-1729, 1999.
- [116] N. Kunishima et al., Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor, *Nature*, 407, 971-977, 2000.
- [117] T. Muto et al., Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3759-3764, 2007.
- [118] S. Huang et al., Interdomain movements in metabotropic glutamate receptor activation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 15480-15485, 2011.
- [119] L. Chun et al., Structure and ligand recognition of class C GPCRs, *Acta Pharmacol Sin*, 33, 312-323, 2012.
- [120] J. P. Pin et al., Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors, *Pharmacol Ther*, 98, 325-354, 2003.
- [121] F. Zhang et al., Molecular mechanism for the umami taste synergism, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20930-20934, 2008.
- [122] C. Romano et al., Metabotropic glutamate receptor 5 is a disulfide-linked dimer, *J Biol Chem*, 271, 28612-28616, 1996.
- [123] J. Levitz et al., Mechanism of Assembly and Cooperativity of Homomeric and Heteromeric Metabotropic Glutamate Receptors, *Neuron*, 92, 143-159, 2016.
- [124] H. Bräuner-Osborne et al., Structure, pharmacology and therapeutic prospects of family C G-protein coupled receptors, *Curr Drug Targets*, 8, 169-184, 2007.
- [125] M. Masu et al., Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor, *Nature*, 349, 760-765, 1991.
- [126] K. M. Houamed et al., Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain, *Science*, 252, 1318-1321, 1991.

- [127] Y. Zhou & N. C. Danbolt, Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain, *J Neural Transm (Vienna)*, 121, 799-817, 2014.
- [128] P. Newsholme et al., Glutamine and glutamate as vital metabolites, *Braz J Med Biol Res*, 36, 153-163, 2003.
- [129] P. J. Conn & J. P. Pin, Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 37, 205-237, 1997.
- [130] M. Julio-Pieper et al., Exciting times beyond the brain: metabotropic glutamate receptors in peripheral and non-neural tissues, *Pharmacol Rev*, 63, 35-58, 2011.
- [131] S. Nakanishi, Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function, *Science*, 258, 597-603, 1992.
- [132] J. P. Pin & R. Duvoisin, The metabotropic glutamate receptors: structure and functions, *Neuropharmacology*, 34, 1-26, 1995.
- [133] K. Eddy et al., Implications of a Neuronal Receptor Family, Metabotropic Glutamate Receptors, in Cancer Development and Progression, *Cells*, 11, 2022.
- [134] E. Hermans & R. A. Challiss, Structural, signalling and regulatory properties of the group I metabotropic glutamate receptors: prototypic family C G-protein-coupled receptors, *Biochem J*, 359, 465-484, 2001.
- [135] Y. Nakajima et al., Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 11868-11873, 1993.
- [136] C. W. Morgans et al., TRPM1: the endpoint of the mGluR6 signal transduction cascade in retinal ON-bipolar cells, *Bioessays*, 32, 609-614, 2010.
- [137] H. Kano et al., Structural mechanism underlying G protein family-specific regulation of G protein-gated inwardly rectifying potassium channel, *Nat Commun*, 10, 2008, 2019.
- [138] S. Choi & D. M. Lovinger, Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca²⁺ channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons, *J Neurosci*, 16, 36-45, 1996.
- [139] G. W. Zamponi & K. P. Currie, Regulation of Ca(V)₂ calcium channels by G protein coupled receptors, *Biochim Biophys Acta*, 1828, 1629-1643, 2013.
- [140] S. Azam et al., Group I mGluRs in Therapy and Diagnosis of Parkinson's Disease: Focus on mGluR5 Subtype, *Biomedicines*, 10, 2022.

- [141] A. Srivastava et al., Metabotropic Glutamate Receptors in Alzheimer's Disease Synaptic Dysfunction: Therapeutic Opportunities and Hope for the Future, *J Alzheimers Dis*, 78, 1345-1361, 2020.
- [142] C. R. McCudden et al., G-protein signaling: back to the future, *Cell Mol Life Sci*, 62, 551-577, 2005.
- [143] R. R. Neubig & D. P. Siderovski, Regulators of G-protein signalling as new central nervous system drug targets, *Nat Rev Drug Discov*, 1, 187-197, 2002.
- [144] N. B. Senese et al., Regulator of G-Protein Signaling (RGS) Protein Modulation of Opioid Receptor Signaling as a Potential Target for Pain Management, *Front Mol Neurosci*, 13, 5, 2020.
- [145] R. Zhai et al., Double life: How GRK2 and beta-arrestin signaling participate in diseases, *Cell Signal*, 94, 110333, 2022.
- [146] D. A. Yarmolinsky et al., Common sense about taste: from mammals to insects, *Cell*, 139, 234-244, 2009.
- [147] S. R. Foster et al., Extrasensory perception: odorant and taste receptors beyond the nose and mouth, *Pharmacol Ther*, 142, 41-61, 2014.
- [148] A. A. Bachmanov & G. K. Beauchamp, Taste receptor genes, *Annu Rev Nutr*, 27, 389-414, 2007.
- [149] N. Chaudhari & S. D. Roper, The cell biology of taste, *J Cell Biol*, 190, 285-296, 2010.
- [150] R. D. Mattes, Is there a fatty acid taste?, *Annu Rev Nutr*, 29, 305-327, 2009.
- [151] C. A. Running et al., Oleogustus: The Unique Taste of Fat, *Chem Senses*, 40, 507-516, 2015.
- [152] M. M. Galindo et al., G protein-coupled receptors in human fat taste perception, *Chem Senses*, 37, 123-139, 2012.
- [153] D. Gaillard & S. C. Kinnamon, New evidence for fat as a primary taste quality, *Acta Physiol (Oxf)*, 226, e13246, 2019.
- [154] R. D. Mattes, Accumulating evidence supports a taste component for free fatty acids in humans, *Physiol Behav*, 104, 624-631, 2011.
- [155] M. Sawzdargo et al., A cluster of four novel human G protein-coupled receptor genes occurring in close proximity to CD22 gene on chromosome 19q13.1, *Biochem Biophys Res Commun*, 239, 543-547, 1997.

- [156] E. Adler et al., A novel family of mammalian taste receptors, *Cell*, 100, 693-702, 2000.
- [157] J. Chandrashekar et al., T2Rs function as bitter taste receptors, *Cell*, 100, 703-711, 2000.
- [158] X. Li et al., Human receptors for sweet and umami taste, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4692-4696, 2002.
- [159] G. Nelson et al., Mammalian sweet taste receptors, *Cell*, 106, 381-390, 2001.
- [160] G. Nelson et al., An amino-acid taste receptor, *Nature*, 416, 199-202, 2002.
- [161] M. Max et al., Tas1r3, encoding a new candidate taste receptor, is allelic to the sweet responsiveness locus Sac, *Nat Genet*, 28, 58-63, 2001.
- [162] J. P. Montmayeur & H. Matsunami, Receptors for bitter and sweet taste, *Curr Opin Neurobiol*, 12, 366-371, 2002.
- [163] H. Xu et al., Different functional roles of T1R subunits in the heteromeric taste receptors, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 14258-14263, 2004.
- [164] Y. Nie et al., Distinct contributions of T1R2 and T1R3 taste receptor subunits to the detection of sweet stimuli, *Curr Biol*, 15, 1948-1952, 2005.
- [165] W. Meyerhof et al., The molecular receptive ranges of human TAS2R bitter taste receptors, *Chem Senses*, 35, 157-170, 2010.
- [166] M. A. Hoon et al., Putative mammalian taste receptors: a class of taste-specific GPCRs with distinct topographic selectivity, *Cell*, 96, 541-551, 1999.
- [167] T. A. Vilgis, Geschmack und Wahrnehmung, In *Ernährung bei Pflegebedürftigkeit und Demenz*, pp 19-36, Springer Verlag, Wien, 2015.
- [168] D. Kikut-Ligaj & J. Trzcielinska-Lorych, How taste works: cells, receptors and gustatory perception, *Cell Mol Biol Lett*, 20, 699-716, 2015.
- [169] S. D. Roper, Taste buds as peripheral chemosensory processors, *Semin Cell Dev Biol*, 24, 71-79, 2013.
- [170] D. L. Bartel et al., Nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 is the ecto-ATPase of type I cells in taste buds, *J Comp Neurol*, 497, 1-12, 2006.
- [171] S. M. Tomchik et al., Breadth of tuning and taste coding in mammalian taste buds, *J Neurosci*, 27, 10840-10848, 2007.

- [172] R. Yoshida et al., Taste responsiveness of fungiform taste cells with action potentials, *J Neurophysiol*, 96, 3088-3095, 2006.
- [173] Y. J. Huang et al., The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 6436-6441, 2007.
- [174] T. E. Finger et al., ATP signaling is crucial for communication from taste buds to gustatory nerves, *Science*, 310, 1495-1499, 2005.
- [175] P. Jiang et al., The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins, *J Biol Chem*, 279, 45068-45075, 2004.
- [176] P. A. Temussi, Why are sweet proteins sweet? Interaction of brazzein, monellin and thaumatin with the T1R2-T1R3 receptor, *FEBS Lett*, 526, 1-4, 2002.
- [177] M. Cui et al., The heterodimeric sweet taste receptor has multiple potential ligand binding sites, *Curr Pharm Des*, 12, 4591-4600, 2006.
- [178] M. Behrens et al., Sweet and umami taste: natural products, their chemosensory targets, and beyond, *Angew Chem Int Ed Engl*, 50, 2220-2242, 2011.
- [179] J. Chéron et al., Natural Sweeteners, In *Encyclopedia of Food Chemistry*, pp 189-195, 2019.
- [180] O. G. Mouritsen & H. Khandelia, Molecular mechanism of the allosteric enhancement of the umami taste sensation, *FEBS J*, 279, 3112-3120, 2012.
- [181] H. Liu et al., Understanding the molecular mechanism of umami recognition by T1R1-T1R3 using molecular dynamics simulations, *Biochem Biophys Res Commun*, 514, 967-973, 2019.
- [182] S. Damak et al., Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3, *Science*, 301, 850-853, 2003.
- [183] K. Yasumatsu et al., Multiple receptors underlie glutamate taste responses in mice, *Am J Clin Nutr*, 90, 747S-752S, 2009.
- [184] G. Q. Zhao et al., The receptors for mammalian sweet and umami taste, *Cell*, 115, 255-266, 2003.
- [185] Y. Maruyama et al., Umami responses in mouse taste cells indicate more than one receptor, *J Neurosci*, 26, 2227-2234, 2006.
- [186] N. Chaudhari et al., A metabotropic glutamate receptor variant functions as a taste receptor, *Nat Neurosci*, 3, 113-119, 2000.

- [187] T. Toyono et al., Expression of metabotropic glutamate receptor group I in rat gustatory papillae, *Cell Tissue Res*, 313, 29-35, 2003.
- [188] T. Toyono et al., Expression of the metabotropic glutamate receptor, mGluR4a, in the taste hairs of taste buds in rat gustatory papillae, *Arch Histol Cytol*, 65, 91-96, 2002.
- [189] T. Toyono et al., Expression of group II metabotropic glutamate receptors in rat gustatory papillae, *Cell Tissue Res*, 328, 57-63, 2007.
- [190] A. San Gabriel et al., The calcium-sensing receptor in taste tissue, *Biochem Biophys Res Commun*, 378, 414-418, 2009.
- [191] M. F. Bystrova et al., Functional expression of the extracellular-Ca²⁺-sensing receptor in mouse taste cells, *J Cell Sci*, 123, 972-982, 2010.
- [192] S. K. McLaughlin et al., Gustducin is a taste-cell-specific G protein closely related to the transducins, *Nature*, 357, 563-569, 1992.
- [193] G. T. Wong et al., Transduction of bitter and sweet taste by gustducin, *Nature*, 381, 796-800, 1996.
- [194] L. Huang et al., Ggamma13 colocalizes with gustducin in taste receptor cells and mediates IP₃ responses to bitter denatonium, *Nat Neurosci*, 2, 1055-1062, 1999.
- [195] P. Rössler et al., Identification of a phospholipase C beta subtype in rat taste cells, *Eur J Cell Biol*, 77, 253-261, 1998.
- [196] C. Hisatsune et al., Abnormal taste perception in mice lacking the type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, *J Biol Chem*, 282, 37225-37231, 2007.
- [197] T. R. Clapp et al., Immunocytochemical evidence for co-expression of Type III IP₃ receptor with signaling components of bitter taste transduction, *BMC Neurosci*, 2, 6, 2001.
- [198] M. A. Miyoshi et al., IP(3) receptor type 3 and PLCbeta2 are co-expressed with taste receptors T1R and T2R in rat taste bud cells, *Chem Senses*, 26, 259-265, 2001.
- [199] C. A. Perez et al., A transient receptor potential channel expressed in taste receptor cells, *Nat Neurosci*, 5, 1169-1176, 2002.
- [200] T. Hofmann et al., TRPM5 is a voltage-modulated and Ca(2+)-activated monovalent selective cation channel, *Curr Biol*, 13, 1153-1158, 2003.
- [201] D. Liu & E. R. Liman, Intracellular Ca²⁺ and the phospholipid PIP₂ regulate the taste transduction ion channel TRPM5, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 15160-15165, 2003.

- [202] Z. Zhang et al., The transduction channel TRPM5 is gated by intracellular calcium in taste cells, *J Neurosci*, 27, 5777-5786, 2007.
- [203] S. C. Kinnamon, Taste receptor signalling - from tongues to lungs, *Acta Physiol (Oxf)*, 204, 158-168, 2012.
- [204] A. Taruno et al., How do taste cells lacking synapses mediate neurotransmission? CALHM1, a voltage-gated ATP channel, *Bioessays*, 35, 1111-1118, 2013.
- [205] Z. Ma et al., CALHM3 Is Essential for Rapid Ion Channel-Mediated Purinergic Neurotransmission of GPCR-Mediated Tastes, *Neuron*, 98, 547-561 e510, 2018.
- [206] Y. A. Huang et al., Knocking out P2X receptors reduces transmitter secretion in taste buds, *J Neurosci*, 31, 13654-13661, 2011.
- [207] W. Yan et al., Bitter taste transduced by PLC-beta(2)-dependent rise in IP(3) and alpha-gustducin-dependent fall in cyclic nucleotides, *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C742-751, 2001.
- [208] T. R. Clapp et al., Tonic activity of Galpha-gustducin regulates taste cell responsivity, *FEBS Lett*, 582, 3783-3787, 2008.
- [209] S. C. Kinnamon & A. Vandenbeuch, Receptors and transduction of umami taste stimuli, *Ann N Y Acad Sci*, 1170, 55-59, 2009.
- [210] A. Luddi et al., Taste Receptors: New Players in Sperm Biology, *Int J Mol Sci*, 20, 2019.
- [211] E. Feldmesser et al., Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes, *BMC Genomics*, 7, 121, 2006.
- [212] P. Marcinek et al., Chemosensory G Protein-Coupled Receptors (GPCR) in Blood Leukocytes, In *Taste and Smell*, pp 151-173, 2016.
- [213] M. Sharma, Chemokines and their receptors: orchestrating a fine balance between health and disease, *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 1-22, 2010.
- [214] S. A. Lira & G. C. Furtado, The biology of chemokines and their receptors, *Immunol Res*, 54, 111-120, 2012.
- [215] Y. Li & D. Ye, Molecular biology for formyl peptide receptors in human diseases, *J Mol Med (Berl)*, 91, 781-789, 2013.
- [216] I. Migeotte et al., Formyl peptide receptors: a promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses, *Cytokine Growth Factor Rev*, 17, 501-519, 2006.

- [217] Y. Zhuang et al., Molecular recognition of formylpeptides and diverse agonists by the formylpeptide receptors FPR1 and FPR2, *Nat Commun*, 13, 1054, 2022.
- [218] P. A. Ward, Role of the complement in experimental sepsis, *J Leukoc Biol*, 83, 467-470, 2008.
- [219] S. Lukacsi et al., Utilization of complement receptors in immune cell-microbe interaction, *FEBS Lett*, 594, 2695-2713, 2020.
- [220] M. A. Vinolo et al., SCFAs induce mouse neutrophil chemotaxis through the GPR43 receptor, *PLoS One*, 6, e21205, 2011.
- [221] K. M. Maslowski et al., Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43, *Nature*, 461, 1282-1286, 2009.
- [222] A. Malki et al., Class I odorant receptors, TAS1R and TAS2R taste receptors, are markers for subpopulations of circulating leukocytes, *J Leukoc Biol*, 97, 533-545, 2015.
- [223] E. A. Feingold et al., An olfactory receptor gene is located in the extended human beta-globin gene cluster and is expressed in erythroid cells, *Genomics*, 61, 15-23, 1999.
- [224] C. Flegel et al., Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing, *PLoS One*, 8, e55368, 2013.
- [225] W. Zhao et al., Decreased level of olfactory receptors in blood cells following traumatic brain injury and potential association with tauopathy, *J Alzheimers Dis*, 34, 417-429, 2013.
- [226] M. Ekoff et al., Bitter taste receptor (TAS2R) agonists inhibit IgE-dependent mast cell activation, *J Allergy Clin Immunol*, 134, 475-478, 2014.
- [227] C. Orsmark-Pietras et al., Transcriptome analysis reveals upregulation of bitter taste receptors in severe asthmatics, *Eur Respir J*, 42, 65-78, 2013.
- [228] T. Skurk et al., Sweetener System Intervention Shifted Neutrophils from Homeostasis to Priming, *Nutrients*, 15, 2023.
- [229] R. Pacheco et al., Group I metabotropic glutamate receptors mediate a dual role of glutamate in T cell activation, *J Biol Chem*, 279, 33352-33358, 2004.
- [230] A. A. Boldyrev et al., Emerging evidence for a similar role of glutamate receptors in the nervous and immune systems, *J Neurochem*, 95, 913-918, 2005.

- [231] G. Miglio et al., Stimulation of group I metabotropic glutamate receptors evokes calcium signals and c-jun and c-fos gene expression in human T cells, *Biochem Pharmacol*, 70, 189-199, 2005.
- [232] A. Chiocchetti et al., Group I mGlu receptor stimulation inhibits activation-induced cell death of human T lymphocytes, *Br J Pharmacol*, 148, 760-768, 2006.
- [233] G. Lombardi et al., Characterization of ionotropic glutamate receptors in human lymphocytes, *Br J Pharmacol*, 133, 936-944, 2001.
- [234] T. Lämmermann & W. Kastner, Concepts of GPCR-controlled navigation in the immune system, *Immunol Rev*, 289, 205-231, 2019.
- [235] B. A. Zabel et al., Leukocyte chemoattractant receptors in human disease pathogenesis, *Annu Rev Pathol*, 10, 51-81, 2015.
- [236] D. F. Legler & M. Thelen, New insights in chemokine signaling, *F1000Res*, 7, 95, 2018.
- [237] P. J. Groot-Kormelink et al., Quantitative GPCR and ion channel transcriptomics in primary alveolar macrophages and macrophage surrogates, *BMC Immunol*, 13, 57, 2012.
- [238] H. H. Lin & M. Stacey, G Protein-Coupled Receptors in Macrophages, *Microbiol Spectr*, 4, 2016.
- [239] Y. Liu & G. Shi, Role of G protein-coupled receptors in control of dendritic cell migration, *Biomed Res Int*, 2014, 738253, 2014.
- [240] M. C. Dieu et al., Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites, *J Exp Med*, 188, 373-386, 1998.
- [241] A. A. Maghazachi, G protein-coupled receptors in natural killer cells, *J Leukoc Biol*, 74, 16-24, 2003.
- [242] T. Walzer & E. Vivier, G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration, *Trends Immunol*, 32, 486-492, 2011.
- [243] M. Metzemaekers et al., Neutrophil chemoattractant receptors in health and disease: double-edged swords, *Cellular & Molecular Immunology*, 17, 433-450, 2020.
- [244] E. Lu & J. G. Cyster, G-protein coupled receptors and ligands that organize humoral immune responses, *Immunol Rev*, 289, 158-172, 2019.
- [245] A. Nugent & R. L. Proia, The role of G protein-coupled receptors in lymphoid malignancies, *Cell Signal*, 39, 95-107, 2017.

- [246] D. Wang, The essential role of G protein-coupled receptor (GPCR) signaling in regulating T cell immunity, *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 40, 187-192, 2018.
- [247] A. G. Fisher, Cellular identity and lineage choice, *Nat Rev Immunol*, 2, 977-982, 2002.
- [248] A. Torang et al., An elastic-net logistic regression approach to generate classifiers and gene signatures for types of immune cells and T helper cell subsets, *BMC Bioinformatics*, 20, 433, 2019.
- [249] J. Parkin & B. Cohen, An overview of the immune system, *Lancet*, 357, 1777-1789, 2001.
- [250] A. Hidalgo et al., The Neutrophil Life Cycle, *Trends Immunol*, 40, 584-597, 2019.
- [251] P. X. Liew & P. Kubes, The Neutrophil's Role During Health and Disease, *Physiol Rev*, 99, 1223-1248, 2019.
- [252] N. Borregaard, Neutrophils, from marrow to microbes, *Immunity*, 33, 657-670, 2010.
- [253] M. Faurschou & N. Borregaard, Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, *Microbes Infect*, 5, 1317-1327, 2003.
- [254] J. B. Cowland & N. Borregaard, Granulopoiesis and granules of human neutrophils, *Immunol Rev*, 273, 11-28, 2016.
- [255] K. L. Vogt et al., Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo, *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2, e12967, 2018.
- [256] V. Brinkmann et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science*, 303, 1532-1535, 2004.
- [257] V. Papayannopoulos, Neutrophil extracellular traps in immunity and disease, *Nat Rev Immunol*, 18, 134-147, 2018.
- [258] B. Petri & M. J. Sanz, Neutrophil chemotaxis, *Cell Tissue Res*, 371, 425-436, 2018.
- [259] K. Kienle & T. Lammermann, Neutrophil swarming: an essential process of the neutrophil tissue response, *Immunol Rev*, 273, 76-93, 2016.
- [260] T. Lämmermann, In the eye of the neutrophil swarm-navigation signals that bring neutrophils together in inflamed and infected tissues, *J Leukoc Biol*, 100, 55-63, 2016.
- [261] K. Futosi et al., Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways, *Int Immunopharmacol*, 17, 638-650, 2013.

- [262] C. D. Sadik et al., Neutrophils cascading their way to inflammation, *Trends Immunol*, 32, 452-460, 2011.
- [263] K. Murphy & C. Weaver, *Janeway Immunologie*, 9 ed., Springer Spektrum Berlin, Heidelberg, 2018.
- [264] R. L. E. Cano & H. D. E. Lopera, Introduction to T and B lymphocytes, In *Autoimmunity: From Bench to Bedside* (Anaya, J., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R., and Cervera, R., Eds.), pp 77-95, El Rosario University Press, Bogota (Colombia), 2013.
- [265] J. F. Foley et al., Differentiation of human T cells alters their repertoire of G protein alpha-subunits, *J Biol Chem*, 285, 35537-35550, 2010.
- [266] M. F. Krummel et al., T cell migration, search strategies and mechanisms, *Nat Rev Immunol*, 16, 193-201, 2016.
- [267] O. Schulz et al., Chemokines and Chemokine Receptors in Lymphoid Tissue Dynamics, *Annu Rev Immunol*, 34, 203-242, 2016.
- [268] M. Parmentier et al., Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells, *Nature*, 355, 453-455, 1992.
- [269] P. Vanderhaeghen et al., Specific repertoire of olfactory receptor genes in the male germ cells of several mammalian species, *Genomics*, 39, 239-246, 1997.
- [270] T. Goto et al., Expression of a testis-specific member of the olfactory receptor gene family in human primordial germ cells, *Mol Hum Reprod*, 7, 553-558, 2001.
- [271] M. Spehr et al., Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis, *Science*, 299, 2054-2058, 2003.
- [272] M. Spehr et al., Particulate adenylate cyclase plays a key role in human sperm olfactory receptor-mediated chemotaxis, *J Biol Chem*, 279, 40194-40203, 2004.
- [273] D. Milardi et al., Olfactory Receptors in Semen and in the Male Tract: From Proteome to Proteins, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 379, 2017.
- [274] E. M. Neuhaus et al., Novel function of beta-arrestin2 in the nucleus of mature spermatozoa, *J Cell Sci*, 119, 3047-3056, 2006.
- [275] B. Kalbe et al., Olfactory signaling components and olfactory receptors are expressed in tubule cells of the human kidney, *Arch Biochem Biophys*, 610, 8-15, 2016.

- [276] B. D. Shepard et al., A Renal Olfactory Receptor Aids in Kidney Glucose Handling, *Sci Rep*, 6, 35215, 2016.
- [277] L. L. Xu et al., PSGR, a novel prostate-specific gene with homology to a G protein-coupled receptor, is overexpressed in prostate cancer, *Cancer research*, 60, 6568-6572, 2000.
- [278] C. Xia et al., Identification of a prostate-specific G-protein coupled receptor in prostate cancer, *Oncogene*, 20, 5903-5907, 2001.
- [279] E. M. Neuhaus et al., Activation of an olfactory receptor inhibits proliferation of prostate cancer cells, *J Biol Chem*, 284, 16218-16225, 2009.
- [280] J. L. Pluznick et al., Functional expression of the olfactory signaling system in the kidney, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 2059-2064, 2009.
- [281] S. H. Kim et al., Expression of human olfactory receptor 10J5 in heart aorta, coronary artery, and endothelial cells and its functional role in angiogenesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 404-408, 2015.
- [282] N. Jovancevic et al., Medium-chain fatty acids modulate myocardial function via a cardiac odorant receptor, *Basic Res Cardiol*, 112, 13, 2017.
- [283] B. Kalbe et al., Olfactory Receptors Modulate Physiological Processes in Human Airway Smooth Muscle Cells, *Front Physiol*, 7, 339, 2016.
- [284] T. Braun et al., Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants, *Gastroenterology*, 132, 1890-1901, 2007.
- [285] K. S. Kim et al., Activation of intestinal olfactory receptor stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in enteroendocrine cells and attenuates hyperglycemia in type 2 diabetic mice, *Sci Rep*, 7, 13978, 2017.
- [286] J. L. Pluznick et al., Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 4410-4415, 2013.
- [287] J. L. Pluznick, Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors, *Kidney Int*, 90, 1191-1198, 2016.
- [288] N. Kang et al., Olfactory receptor Olfr544 responding to azelaic acid regulates glucagon secretion in alpha-cells of mouse pancreatic islets, *Biochem Biophys Res Commun*, 460, 616-621, 2015.

- [289] J. Leem et al., Octanoic acid potentiates glucose-stimulated insulin secretion and expression of glucokinase through the olfactory receptor in pancreatic beta-cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 503, 278-284, 2018.
- [290] C. Wu et al., Activation of OR1A1 suppresses PPAR-gamma expression by inducing HES-1 in cultured hepatocytes, *Int J Biochem Cell Biol*, 64, 75-80, 2015.
- [291] T. Tong et al., Olfactory receptor 10J5 responding to alpha-cedrene regulates hepatic steatosis via the cAMP-PKA pathway, *Sci Rep*, 7, 9471, 2017.
- [292] T. Tong et al., Ectopic Odorant Receptor Responding to Flavor Compounds: Versatile Roles in Health and Disease, *Pharmaceutics*, 13, 2021.
- [293] D. Busse et al., A synthetic sandalwood odorant induces wound-healing processes in human keratinocytes via the olfactory receptor OR2AT4, *J Invest Dermatol*, 134, 2823-2832, 2014.
- [294] T. Tsai et al., Two olfactory receptors-OR2A4/7 and OR51B5-differentially affect epidermal proliferation and differentiation, *Exp Dermatol*, 26, 58-65, 2017.
- [295] L. Gelis et al., Functional Characterization of the Odorant Receptor 51E2 in Human Melanocytes, *J Biol Chem*, 291, 17772-17786, 2016.
- [296] J. Cheret et al., Olfactory receptor OR2AT4 regulates human hair growth, *Nat Commun*, 9, 3624, 2018.
- [297] B. Kalbe et al., OR2H2 regulates the differentiation of human myoblast cells by its ligand aldehyde 13-13, *Arch Biochem Biophys*, 645, 72-80, 2018.
- [298] W. H. Aisenberg et al., Defining an olfactory receptor function in airway smooth muscle cells, *Sci Rep*, 6, 38231, 2016.
- [299] J. J. Li et al., Activation of olfactory receptors on mouse pulmonary macrophages promotes monocyte chemotactic protein-1 production, *PLoS One*, 8, e80148, 2013.
- [300] C. Geithe et al., A Butter Aroma Recombinate Activates Human Class-I Odorant Receptors, *J Agric Food Chem*, 63, 9410-9420, 2015.
- [301] D. Maßberg & H. Hatt, Human Olfactory Receptors: Novel Cellular Functions Outside of the Nose, *Physiol Rev*, 98, 1739-1763, 2018.
- [302] P. Garcia-Esparcia et al., Functional genomics reveals dysregulation of cortical olfactory receptors in Parkinson disease: novel putative chemoreceptors in the human brain, *J Neuropathol Exp Neurol*, 72, 524-539, 2013.

- [303] B. Ansoleaga et al., Decrease in olfactory and taste receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex in chronic schizophrenia, *J Psychiatr Res*, 60, 109-116, 2015.
- [304] B. Ansoleaga et al., Dysregulation of brain olfactory and taste receptors in AD, PSP and CJD, and AD-related model, *Neuroscience*, 248, 369-382, 2013.
- [305] T. Abaffy et al., A Testosterone Metabolite 19-Hydroxyandrostenedione Induces Neuroendocrine Trans-Differentiation of Prostate Cancer Cells via an Ectopic Olfactory Receptor, *Front Oncol*, 8, 162, 2018.
- [306] J. Weng et al., PSGR2, a novel G-protein coupled receptor, is overexpressed in human prostate cancer, *Int J Cancer*, 118, 1471-1480, 2006.
- [307] T. Cui et al., Olfactory receptor 51E1 protein as a potential novel tissue biomarker for small intestine neuroendocrine carcinomas, *Eur J Endocrinol*, 168, 253-261, 2013.
- [308] R. Morita et al., Olfactory Receptor Family 7 Subfamily C Member 1 Is a Novel Marker of Colon Cancer-Initiating Cells and Is a Potent Target of Immunotherapy, *Clin Cancer Res*, 22, 3298-3309, 2016.
- [309] X. Guo et al., Long noncoding RNA OR3A4 promotes metastasis and tumorigenicity in gastric cancer, *Oncotarget*, 7, 30276-30294, 2016.
- [310] J. Leja et al., Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas, *Mod Pathol*, 22, 261-272, 2009.
- [311] L. Weber et al., Olfactory Receptors as Biomarkers in Human Breast Carcinoma Tissues, *Front Oncol*, 8, 33, 2018.
- [312] V. Giandomenico et al., Olfactory receptor 51E1 as a novel target for diagnosis in somatostatin receptor-negative lung carcinoids, *J Mol Endocrinol*, 51, 277-286, 2013.
- [313] B. Kalbe et al., Helional-induced activation of human olfactory receptor 2J3 promotes apoptosis and inhibits proliferation in a non-small-cell lung cancer cell line, *Eur J Cell Biol*, 96, 34-46, 2017.
- [314] R. Kerslake et al., Co-expression of peripheral olfactory receptors with SARS-CoV-2 infection mediators: Potential implications beyond loss of smell as a COVID-19 symptom, *Int J Mol Med*, 46, 949-956, 2020.
- [315] R. L. Doty, Olfactory dysfunction in COVID-19: pathology and long-term implications for brain health, *Trends Mol Med*, 28, 781-794, 2022.
- [316] S. Y. Ki & Y. T. Jeong, Taste Receptors beyond Taste Buds, *Int J Mol Sci*, 23, 2022.

- [317] K. Taniguchi, Expression of the sweet receptor protein, T1R3, in the human liver and pancreas, *J Vet Med Sci*, 66, 1311-1314, 2004.
- [318] Y. Nakagawa et al., Sweet taste receptor expressed in pancreatic beta-cells activates the calcium and cyclic AMP signaling systems and stimulates insulin secretion, *PLoS One*, 4, e5106, 2009.
- [319] G. A. Kyriazis et al., Sweet taste receptor signaling in beta cells mediates fructose-induced potentiation of glucose-stimulated insulin secretion, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, E524-532, 2012.
- [320] R. F. Margolskee et al., T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na⁺-glucose cotransporter 1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15075-15080, 2007.
- [321] O. J. Mace et al., Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2, *J Physiol*, 582, 379-392, 2007.
- [322] N. Hass et al., T1R3 is expressed in brush cells and ghrelin-producing cells of murine stomach, *Cell Tissue Res*, 339, 493-504, 2010.
- [323] J. Dyer et al., Expression of sweet taste receptors of the T1R family in the intestinal tract and enteroendocrine cells, *Biochem Soc Trans*, 33, 302-305, 2005.
- [324] H. J. Jang et al., Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 15069-15074, 2007.
- [325] A. C. Gerspach et al., The role of the gut sweet taste receptor in regulating GLP-1, PYY, and CCK release in humans, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301, E317-325, 2011.
- [326] R. E. Steinert et al., The functional involvement of gut-expressed sweet taste receptors in glucose-stimulated secretion of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and peptide YY (PYY), *Clin Nutr*, 30, 524-532, 2011.
- [327] Z. Kokrashvili et al., T1r3 and alpha-gustducin in gut regulate secretion of glucagon-like peptide-1, *Ann N Y Acad Sci*, 1170, 91-94, 2009.
- [328] M. R. Howitt et al., The Taste Receptor TAS1R3 Regulates Small Intestinal Tuft Cell Homeostasis, *Immunohorizons*, 4, 23-32, 2020.
- [329] K. Smith et al., T1R2 receptor-mediated glucose sensing in the upper intestine potentiates glucose absorption through activation of local regulatory pathways, *Mol Metab*, 17, 98-111, 2018.
- [330] D. M. Kendig et al., Activation of the umami taste receptor (T1R1/T1R3) initiates the peristaltic reflex and pellet propulsion in the distal colon, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 307, G1100-1107, 2014.

- [331] K. Daly et al., Sensing of amino acids by the gut-expressed taste receptor T1R1-T1R3 stimulates CCK secretion, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304, G271-282, 2013.
- [332] L. Vancleef et al., Chemosensory signalling pathways involved in sensing of amino acids by the ghrelin cell, *Sci Rep*, 5, 15725, 2015.
- [333] X. Ren et al., Sweet taste signaling functions as a hypothalamic glucose sensor, *Front Integr Neurosci*, 3, 12, 2009.
- [334] D. Kohno et al., Sweet Taste Receptor Serves to Activate Glucose- and Leptin-Responsive Neurons in the Hypothalamic Arcuate Nucleus and Participates in Glucose Responsiveness, *Front Neurosci*, 10, 502, 2016.
- [335] D. Kohno, Sweet taste receptor in the hypothalamus: a potential new player in glucose sensing in the hypothalamus, *J Physiol Sci*, 67, 459-465, 2017.
- [336] J. H. Jang et al., Whole-Brain Mapping of the Expression Pattern of T1R2, a Subunit Specific to the Sweet Taste Receptor, *Front Neuroanat*, 15, 751839, 2021.
- [337] R. A. Elliott et al., Expression and distribution of the sweet taste receptor isoforms T1R2 and T1R3 in human and rat bladders, *J Urol*, 186, 2455-2462, 2011.
- [338] E. M. Wauson et al., The G protein-coupled taste receptor T1R1/T1R3 regulates mTORC1 and autophagy, *Mol Cell*, 47, 851-862, 2012.
- [339] E. M. Wauson et al., Amino acid regulation of autophagy through the GPCR TAS1R1-TAS1R3, *Autophagy*, 9, 418-419, 2013.
- [340] S. R. Foster et al., Expression, regulation and putative nutrient-sensing function of taste GPCRs in the heart, *PLoS One*, 8, e64579, 2013.
- [341] D. Meyer et al., Expression of Tas1 taste receptors in mammalian spermatozoa: functional role of Tas1r1 in regulating basal Ca(2)(+) and cAMP concentrations in spermatozoa, *PLoS One*, 7, e32354, 2012.
- [342] N. Lee et al., Mouse neutrophils express functional umami taste receptor T1R1/T1R3, *BMB Rep*, 47, 649-654, 2014.
- [343] K. Taya et al., Trehalose inhibits inflammatory cytokine production by protecting IkappaB-alpha reduction in mouse peritoneal macrophages, *Archives of oral biology*, 54, 749-756, 2009.
- [344] R. J. Lee et al., Bitter and sweet taste receptors regulate human upper respiratory innate immunity, *J Clin Invest*, 124, 1393-1405, 2014.

- [345] R. J. Lee et al., Bacterial d-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells, *Sci Signal*, 10, 2017.
- [346] Y. Qin et al., Type II taste cells participate in mucosal immune surveillance, *PLoS Biol*, 21, e3001647, 2023.
- [347] C. Schneider et al., Regulation of immune responses by tuft cells, *Nat Rev Immunol*, 19, 584-593, 2019.
- [348] X. C. Luo et al., Infection by the parasitic helminth *Trichinella spiralis* activates a Tas2r-mediated signaling pathway in intestinal tuft cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 5564-5569, 2019.
- [349] C. Bezencon et al., Taste-signaling proteins are coexpressed in solitary intestinal epithelial cells, *Chem Senses*, 32, 41-49, 2007.
- [350] D. Herrera Moro Chao et al., Impact of obesity on taste receptor expression in extra-oral tissues: emphasis on hypothalamus and brainstem, *Sci Rep*, 6, 29094, 2016.
- [351] G. Krasteva et al., Cholinergic chemosensory cells in the trachea regulate breathing, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9478-9483, 2011.
- [352] T. E. Finger & S. C. Kinnamon, Taste isn't just for taste buds anymore, *F1000 Biol Rep*, 3, 20, 2011.
- [353] R. L. Young et al., Expression of taste molecules in the upper gastrointestinal tract in humans with and without type 2 diabetes, *Gut*, 58, 337-346, 2009.
- [354] L. Le Gleau et al., Intestinal alteration of alpha-gustducin and sweet taste signaling pathway in metabolic diseases is partly rescued after weight loss and diabetes remission, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 321, E417-E432, 2021.
- [355] B. R. Simon et al., Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass, *PLoS One*, 9, e86454, 2014.
- [356] B. Martin et al., Altered learning, memory, and social behavior in type 1 taste receptor subunit 3 knock-out mice are associated with neuronal dysfunction, *J Biol Chem*, 292, 11508-11530, 2017.
- [357] R. M. Carey et al., Impact of sweet, umami, and bitter taste receptor (TAS1R and TAS2R) genomic and expression alterations in solid tumors on survival, *Sci Rep*, 12, 8937, 2022.
- [358] Q. Hoti et al., Altered expression levels of TAS1R2 and TAS1R3 genes among SARS-CoV-2 variants of concerns, *Preprint*, 2022.

- [359] P. G. Genever et al., Evidence for a novel glutamate-mediated signaling pathway in keratinocytes, *J Invest Dermatol*, 112, 337-342, 1999.
- [360] M. J. Hoogduijn et al., Glutamate receptors on human melanocytes regulate the expression of MiTF, *Pigment Cell Res*, 19, 58-67, 2006.
- [361] C. Frati et al., Expression of functional mGlu5 metabotropic glutamate receptors in human melanocytes, *Journal of Cellular Physiology*, 183, 364-372, 2000.
- [362] C. Chenu et al., Glutamate receptors are expressed by bone cells and are involved in bone resorption, *Bone*, 22, 295-299, 1998.
- [363] Y. Gu & S. J. Publicover, Expression of functional metabotropic glutamate receptors in primary cultured rat osteoblasts. Cross-talk with N-methyl-D-aspartate receptors, *J Biol Chem*, 275, 34252-34259, 2000.
- [364] E. Hinoi et al., Group III metabotropic glutamate receptors in rat cultured calvarial osteoblasts, *Biochem Biophys Res Commun*, 281, 341-346, 2001.
- [365] M. A. Foreman et al., Group III metabotropic glutamate receptor activation inhibits Ca²⁺ influx and nitric oxide synthase activity in bone marrow stromal cells, *J Cell Physiol*, 204, 704-713, 2005.
- [366] R. Morimoto et al., Secretion of L-glutamate from osteoclasts through transcytosis, *EMBO J*, 25, 4175-4186, 2006.
- [367] L. Wang et al., Abolition of chondral mineralization by group III metabotropic glutamate receptors expressed in rodent cartilage, *Br J Pharmacol*, 146, 732-743, 2005.
- [368] M. Storto et al., Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis, *J Endocrinol*, 170, 71-78, 2001.
- [369] S. S. Gill & O. M. Pulido, Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology, *Toxicol Pathol*, 29, 208-223, 2001.
- [370] H. J. Chang et al., Metabotropic glutamate receptor 4 expression in colorectal carcinoma and its prognostic significance, *Clin Cancer Res*, 11, 3288-3295, 2005.
- [371] S. Gill et al., Neuroexcitatory targets in the female reproductive system of the nonhuman primate (*Macaca fascicularis*), *Toxicol Pathol*, 36, 478-484, 2008.
- [372] P. Dewing et al., Membrane estrogen receptor-alpha interactions with metabotropic glutamate receptor 1a modulate female sexual receptivity in rats, *J Neurosci*, 27, 9294-9300, 2007.

- [373] J. Kuo et al., Membrane estrogen receptor-alpha interacts with metabotropic glutamate receptor type 1a to mobilize intracellular calcium in hypothalamic astrocytes, *Endocrinology*, 150, 1369-1376, 2009.
- [374] K. S. Gross & P. G. Mermelstein, Estrogen receptor signaling through metabotropic glutamate receptors, *Vitam Horm*, 114, 211-232, 2020.
- [375] I. Cappuccio et al., Context-dependent regulation of embryonic stem cell differentiation by mGlu4 metabotropic glutamate receptors, *Neuropharmacology*, 51, 606-611, 2006.
- [376] I. Cappuccio et al., Endogenous activation of mGlu5 metabotropic glutamate receptors supports self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells, *Neuropharmacology*, 49 Suppl 1, 196-205, 2005.
- [377] C. Ciceroni et al., mGLU3 metabotropic glutamate receptors modulate the differentiation of SVZ-derived neural stem cells towards the astrocytic lineage, *Glia*, 58, 813-822, 2010.
- [378] N. L. Brice et al., Metabotropic glutamate and GABA(B) receptors contribute to the modulation of glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic beta cells, *Diabetologia*, 45, 242-252, 2002.
- [379] S. Uehara et al., Metabotropic glutamate receptor type 4 is involved in autoinhibitory cascade for glucagon secretion by alpha-cells of islet of Langerhans, *Diabetes*, 53, 998-1006, 2004.
- [380] M. Storto et al., Insulin secretion is controlled by mGlu5 metabotropic glutamate receptors, *Mol Pharmacol*, 69, 1234-1241, 2006.
- [381] S. S. Gill et al., Immunochemical localization of the metabotropic glutamate receptors in the rat heart, *Brain Res Bull*, 48, 143-146, 1999.
- [382] S. Gill et al., Human heart glutamate receptors - implications for toxicology, food safety, and drug discovery, *Toxicol Pathol*, 35, 411-417, 2007.
- [383] A. M. San Gabriel et al., mGluR1 in the fundic glands of rat stomach, *FEBS Lett*, 581, 1119-1123, 2007.
- [384] Q. Tong & A. L. Kirchgessner, Localization and function of metabotropic glutamate receptor 8 in the enteric nervous system, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 285, G992-G1003, 2003.
- [385] W. Dröge et al., Elevated plasma glutamate levels in colorectal carcinoma patients and in patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), *Immunobiology*, 174, 473-479, 1987.

- [386] H. P. Eck et al., Elevated plasma glutamate concentrations in HIV-1-infected patients may contribute to loss of macrophage and lymphocyte functions, *Int Immunol*, 1, 367-372, 1989.
- [387] C. Ferrarese et al., Increased glutamate in CSF and plasma of patients with HIV dementia, *Neurology*, 57, 671-675, 2001.
- [388] H. Xue & C. J. Field, New role of glutamate as an immunoregulator via glutamate receptors and transporters, *Front Biosci (Schol Ed)*, 3, 1007-1020, 2011.
- [389] S. S. Willard & S. Koochekpour, Glutamate signaling in benign and malignant disorders: current status, future perspectives, and therapeutic implications, *Int J Biol Sci*, 9, 728-742, 2013.
- [390] M. S. L. Pereira et al., Metabotropic glutamate receptors as a new therapeutic target for malignant gliomas, *Oncotarget*, 8, 22279-22298, 2017.
- [391] A. Stepulak et al., Expression of glutamate receptor subunits in human cancers, *Histochem Cell Biol*, 132, 435-445, 2009.
- [392] M. Renner et al., Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5, *Neuron*, 66, 739-754, 2010.
- [393] K. S. Abd-Elrahman et al., mGluR5 Contribution to Neuropathology in Alzheimer Mice Is Disease Stage-Dependent, *ACS Pharmacol Transl Sci*, 3, 334-344, 2020.
- [394] G. Valdivia et al., mGluR-dependent plasticity in rodent models of Alzheimer's disease, *Front Synaptic Neurosci*, 15, 1123294, 2023.
- [395] W. W. Wang et al., Effects of mGluR5 Antagonists on Parkinson's Patients With L-Dopa-Induced Dyskinesia: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *Front Aging Neurosci*, 10, 262, 2018.
- [396] Y. N. Zhang et al., Metabotropic glutamate receptor 5 inhibits alpha-synuclein-induced microglia inflammation to protect from neurotoxicity in Parkinson's disease, *J Neuroinflammation*, 18, 23, 2021.
- [397] P. Samadi et al., Metabotropic glutamate receptor II in the brains of Parkinsonian patients, *J Neuropathol Exp Neurol*, 68, 374-382, 2009.
- [398] P. N. Vinson & P. J. Conn, Metabotropic glutamate receptors as therapeutic targets for schizophrenia, *Neuropharmacology*, 62, 1461-1472, 2012.
- [399] H. Y. Wang et al., mGluR5 hypofunction is integral to glutamatergic dysregulation in schizophrenia, *Mol Psychiatry*, 25, 750-760, 2020.

- [400] R. G. Notenboom et al., Up-regulation of hippocampal metabotropic glutamate receptor 5 in temporal lobe epilepsy patients, *Brain*, 129, 96-107, 2006.
- [401] H. Choi et al., In vivo imaging of mGluR5 changes during epileptogenesis using [11C]ABP688 PET in pilocarpine-induced epilepsy rat model, *PLoS One*, 9, e92765, 2014.
- [402] F. M. Ribeiro et al., Metabotropic glutamate receptor-mediated cell signaling pathways are altered in a mouse model of Huntington's disease, *J Neurosci*, 30, 316-324, 2010.
- [403] D. Bertoglio et al., Elevated Type 1 Metabotropic Glutamate Receptor Availability in a Mouse Model of Huntington's Disease: a Longitudinal PET Study, *Mol Neurobiol*, 57, 2038-2047, 2020.
- [404] C. Pouloupoulou et al., Reduced expression of metabotropic glutamate receptor 2mRNA in T cells of ALS patients, *Ann Neurol*, 58, 946-949, 2005.
- [405] J. J. Geurts et al., Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis, *Brain*, 126, 1755-1766, 2003.
- [406] J. J. Geurts et al., Expression patterns of Group III metabotropic glutamate receptors mGluR4 and mGluR8 in multiple sclerosis lesions, *J Neuroimmunol*, 158, 182-190, 2005.
- [407] U. Sh Kuzmina et al., The Role of Glutamate in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis, *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 50, 669-675, 2020.
- [408] Y. Ganor & M. Levite, The neurotransmitter glutamate and human T cells: glutamate receptors and glutamate-induced direct and potent effects on normal human T cells, cancerous human leukemia and lymphoma T cells, and autoimmune human T cells, *J Neural Transm (Vienna)*, 121, 983-1006, 2014.
- [409] I. A. Kostanyan et al., Study of interaction between L-glutamate and human blood lymphocytes, *Immunol Lett*, 58, 177-180, 1997.
- [410] M. Storto et al., Expression of metabotropic glutamate receptors in murine thymocytes and thymic stromal cells, *J Neuroimmunol*, 109, 112-120, 2000.
- [411] R. Rezzani et al., Cyclosporine-A treatment inhibits the expression of metabotropic glutamate receptors in rat thymus, *Acta Histochem*, 105, 81-87, 2003.
- [412] C. Pouloupoulou et al., Modulation of voltage-gated potassium channels in human T lymphocytes by extracellular glutamate, *Mol Pharmacol*, 67, 856-867, 2005.
- [413] D. R. Green et al., Activation-induced cell death in T cells, *Immunol Rev*, 193, 70-81, 2003.

- [414] F. Fallarino et al., Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation, *Nat Med*, 16, 897-902, 2010.
- [415] W. M. Choi et al., Metabotropic Glutamate Receptor 5 in Natural Killer Cells Attenuates Liver Fibrosis by Exerting Cytotoxicity to Activated Stellate Cells, *Hepatology*, 74, 2170-2185, 2021.
- [416] L. J. Rush et al., Epigenetic profiling in chronic lymphocytic leukemia reveals novel methylation targets, *Cancer research*, 64, 2424-2433, 2004.
- [417] Z. Jovic et al., Monosodium glutamate induces apoptosis in naive and memory human B cells, *Bratislavske lekarske listy*, 110, 636-640, 2009.
- [418] R. Gupta et al., Glutamate induces neutrophil cell migration by activating class I metabotropic glutamate receptors, *Amino Acids*, 44, 757-767, 2013.
- [419] R. Gupta & D. Chattopadhyay, Glutamate is the chemotaxis-inducing factor in placental extracts, *Amino Acids*, 37, 271-277, 2009.
- [420] C. D. Collard et al., Neutrophil-derived glutamate regulates vascular endothelial barrier function, *J Biol Chem*, 277, 14801-14811, 2002.
- [421] K. Ray & B. C. Hauschild, Cys-140 is critical for metabotropic glutamate receptor-1 dimerization, *J Biol Chem*, 275, 34245-34251, 2000.
- [422] M. Bai et al., Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor (CaR) on the cell surface of CaR-transfected HEK293 cells, *J Biol Chem*, 273, 23605-23610, 1998.
- [423] D. El Moustaine et al., Distinct roles of metabotropic glutamate receptor dimerization in agonist activation and G-protein coupling, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 16342-16347, 2012.
- [424] A. Ellaithy et al., Structural and Biophysical Mechanisms of Class C G Protein-Coupled Receptor Function, *Trends Biochem Sci*, 45, 1049-1064, 2020.
- [425] F. H. Marshall et al., GABAB receptors - the first 7TM heterodimers, *Trends Pharmacol Sci*, 20, 396-399, 1999.
- [426] J. P. Pin & B. Bettler, Organization and functions of mGlu and GABA(B) receptor complexes, *Nature*, 540, 60-68, 2016.
- [427] K. A. Jones et al., GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2, *Nature*, 396, 674-679, 1998.

- [428] T. Galvez et al., Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function, *EMBO J*, 20, 2152-2159, 2001.
- [429] B. Bettler et al., Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors, *Physiol Rev*, 84, 835-867, 2004.
- [430] E. Doumazane et al., A new approach to analyze cell surface protein complexes reveals specific heterodimeric metabotropic glutamate receptors, *FASEB J*, 25, 66-77, 2011.
- [431] S. Yin et al., Selective actions of novel allosteric modulators reveal functional heteromers of metabotropic glutamate receptors in the CNS, *J Neurosci*, 34, 79-94, 2014.
- [432] T. N. Sevastyanova & P. J. Kammermeier, Cooperative signaling between homodimers of metabotropic glutamate receptors 1 and 5, *Mol Pharmacol*, 86, 492-504, 2014.
- [433] N. J. Pandya et al., Group 1 metabotropic glutamate receptors 1 and 5 form a protein complex in mouse hippocampus and cortex, *Proteomics*, 16, 2698-2705, 2016.
- [434] D. Moreno Delgado et al., Pharmacological evidence for a metabotropic glutamate receptor heterodimer in neuronal cells, *Elife*, 6, 2017.
- [435] C. H. Habrian et al., Conformational pathway provides unique sensitivity to a synaptic mGluR, *Nat Commun*, 10, 5572, 2019.
- [436] T. W. McCulloch & P. Kammermeier, Pharmacology of Metabotropic Glutamate Receptor 2 Homo- and Heterodimers, *The FASEB Journal*, 34, 1-1, 2020.
- [437] T. Kukaj et al., Kinetic fingerprinting of metabotropic glutamate receptors, *Commun Biol*, 6, 104, 2023.
- [438] P. J. Kammermeier, Constitutive activity of metabotropic glutamate receptor 7, *BMC Neurosci*, 16, 17, 2015.
- [439] T. W. McCulloch & P. J. Kammermeier, The evidence for and consequences of metabotropic glutamate receptor heterodimerization, *Neuropharmacology*, 199, 108801, 2021.
- [440] P. J. Kammermeier, Functional and pharmacological characteristics of metabotropic glutamate receptors 2/4 heterodimers, *Mol Pharmacol*, 82, 438-447, 2012.
- [441] J. Liu et al., Allosteric control of an asymmetric transduction in a G protein-coupled receptor heterodimer, *Elife*, 6, 2017.

- [442] R. C. Werthmann et al., Symmetric signal transduction and negative allosteric modulation of heterodimeric mGlu1/5 receptors, *Neuropharmacology*, 190, 108426, 2021.
- [443] J. Lee et al., Defining the Homo- and Heterodimerization Propensities of Metabotropic Glutamate Receptors, *Cell Rep*, 31, 107605, 2020.
- [444] V. Katritch et al., Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 53, 531-556, 2013.
- [445] T. C. Møller et al., Class C G protein-coupled receptors: reviving old couples with new partners, *Biophys Rep*, 3, 57-63, 2017.
- [446] D. Maurel et al., Cell-surface protein-protein interaction analysis with time-resolved FRET and snap-tag technologies: application to GPCR oligomerization, *Nat Methods*, 5, 561-567, 2008.
- [447] L. Comps-Agrar et al., The oligomeric state sets GABA(B) receptor signalling efficacy, *EMBO J*, 30, 2336-2349, 2011.
- [448] L. Comps-Agrar et al., Stability of GABAB receptor oligomers revealed by dual TR-FRET and drug-induced cell surface targeting, *FASEB J*, 26, 3430-3439, 2012.
- [449] D. Calebiro et al., Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 743-748, 2013.
- [450] L. Gama et al., Heterodimerization of calcium sensing receptors with metabotropic glutamate receptors in neurons, *J Biol Chem*, 276, 39053-39059, 2001.
- [451] A. Mafi et al., Predicted Structure of Fully Activated Tas1R3/1R3' Homodimer Bound to G Protein and Natural Sugars: Structural Insights into G Protein Activation by a Class C Sweet Taste Homodimer with Natural Sugars, *J Am Chem Soc*, 143, 16824-16838, 2021.
- [452] B. A. Glatz & J. M. Goepfert, Production of *Bacillus cereus* Enterotoxin in Defined Media in Fermenter-Grown Cultures, *J Food Prot*, 40, 472-474, 1977.
- [453] E. Rosenfeld et al., Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain, *Can J Microbiol*, 51, 149-158, 2005.
- [454] D. Krautwurst et al., Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library, *Cell*, 95, 917-926, 1998.

- [455] S. A. Bustin et al., The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin Chem*, 55, 611-622, 2009.
- [456] A. Schroeder et al., The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *BMC Mol Biol*, 7, 3, 2006.
- [457] K. J. Livak & T. D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods*, 25, 402-408, 2001.
- [458] S. Olmedillas-Lopez et al., Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology: An Updated Review, *Mol Diagn Ther*, 26, 61-87, 2022.
- [459] R. A. Hall, Co-immunoprecipitation as a strategy to evaluate receptor-receptor or receptor-protein interactions., In *G Protein-Coupled Receptor-Protein Interactions* (Dowd B.F, George S. R., Ed.), pp 165-178, Wiley, New Jersey, USA, 2005.
- [460] Y. Shu et al., Discovery of 4-arylquinoline-2-carboxamides, highly potent and selective class of mGluR2 negative allosteric modulators: From HTS to activity in animal models, *Bioorg Med Chem Lett*, 30, 127066, 2020.
- [461] NCBI Resource Coordinators, Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Res*, 46, D8-D13, 2018.
- [462] F. L. Graham et al., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol*, 36, 59-74, 1977.
- [463] B. Hamprecht et al., Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma X glioma hybrid cells, *Methods Enzymol*, 109, 316-341, 1985.
- [464] B. Binkowski et al., Engineered luciferases for molecular sensing in living cells, *Curr Opin Biotechnol*, 20, 14-18, 2009.
- [465] F. Noe et al., A bi-functional IL-6-HaloTag® as a tool to measure the cell-surface expression of recombinant odorant receptors and to facilitate their activity quantification, *J Biol Methods*, 4, e82, 2017.
- [466] H. Saito et al., RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors, *Cell*, 119, 679-691, 2004.
- [467] Y. Tanabe et al., A family of metabotropic glutamate receptors, *Neuron*, 8, 169-179, 1992.
- [468] J. J. Tesmer et al., Crystal structure of the catalytic domains of adenylyl cyclase in a complex with G α .GTP γ S, *Science*, 278, 1907-1916, 1997.

- [469] P. A. Insel & R. S. Ostrom, Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling, *Cell Mol Neurobiol*, 23, 305-314, 2003.
- [470] K. B. Seamon et al., Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 3363-3367, 1981.
- [471] M. Urh & M. Rosenberg, HaloTag, a Platform Technology for Protein Analysis, *Curr Chem Genomics*, 6, 72-78, 2012.
- [472] G. V. Los et al., HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis, *ACS Chem Biol*, 3, 373-382, 2008.
- [473] D. L. Burns, Subunit structure and enzymic activity of pertussis toxin, *Microbiol Sci*, 5, 285-287, 1988.
- [474] L. Ball et al., Heterodimerization of Chemoreceptors TAS1R3 and mGlu(2) in Human Blood Leukocytes, *Int J Mol Sci*, 24, 2023.
- [475] S. M. Marques & J. C. Esteves da Silva, Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions, *IUBMB Life*, 61, 6-17, 2009.
- [476] F. Fan et al., Novel genetically encoded biosensors using firefly luciferase, *ACS Chem Biol*, 3, 346-351, 2008.
- [477] B. F. Binkowski et al., A luminescent biosensor with increased dynamic range for intracellular cAMP, *ACS Chem Biol*, 6, 1193-1197, 2011.
- [478] A. DeLean et al., Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves, *Am J Physiol*, 235, E97-102, 1978.
- [479] M. Dreux & M. Lafosse, Chapter 13: Evaporative Light Scattering Detection of Carbohydrates in HPLC, In *Journal of Chromatography Library* (El Rassi, Z., Ed.), pp 515-540, Elsevier, 1995.
- [480] W. F. Young et al., Taste and odour threshold concentrations of potential potable water contaminants, *Water Research*, 30, 331-340, 1996.
- [481] S. W. Krasner et al., A Standard Method for Quantification of Earthy-Musty Odorants in Water, Sediments, and Algal Cultures, *Water Science and Technology*, 15, 127-138, 1983.
- [482] P. Ömur-Özbek et al., Ability of humans to smell geosmin, 2-MIB and nonadienal in indoor air when using contaminated drinking water, *Water Sci Technol*, 55, 249-256, 2007.

- [483] V. Liato & M. Aider, Geosmin as a source of the earthy-musty smell in fruits, vegetables and water: Origins, impact on foods and water, and review of the removing techniques, *Chemosphere*, 181, 9-18, 2017.
- [484] Y. Niimura, Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents, *Hum Genomics*, 4, 107-118, 2009.
- [485] L. R. Saraiva et al., A transcriptomic atlas of mammalian olfactory mucosae reveals an evolutionary influence on food odor detection in humans, *Sci Adv*, 5, eaax0396, 2019.
- [486] L. Ball et al., Geosmin, a Food- and Water-Deteriorating Sesquiterpenoid and Ambivalent Semiochemical, Activates Evolutionary Conserved Receptor OR11A1, *J Agric Food Chem*, 72, 15865-15874, 2024.
- [487] J. H. Law & F. E. Regnier, Pheromones, *Annu Rev Biochem*, 40, 533-548, 1971.
- [488] Y. Ganor & M. Levite, Glutamate in the Immune System: Glutamate Receptors in Immune Cells, Potent Effects, Endogenous Production and Involvement in Disease, In *Nerve-Driven Immunity*, pp 121-161, 2012.
- [489] R. E. Breitbart et al., Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes, *Annu Rev Biochem*, 56, 467-495, 1987.
- [490] T. A. Ray et al., Comprehensive identification of mRNA isoforms reveals the diversity of neural cell-surface molecules with roles in retinal development and disease, *Nat Commun*, 11, 3328, 2020.
- [491] V. Boss et al., L-cysteine sulfinic acid as an endogenous agonist of a novel metabotropic receptor coupled to stimulation of phospholipase D activity, *Molecular Pharmacology*, 45, 1177-1182, 1994.
- [492] B.S. Meldrum, Glutamate as a Neurotransmitter in the Brain: Review of Physiology and Pathology, *The Journal of Nutrition*, 130, 1007S-1015S, 2000.
- [493] W. Bai et al., Dramatic increases in blood glutamate concentrations are closely related to traumatic brain injury-induced acute lung injury, *Scientific Reports*, 7, 5380, 2017.
- [494] J. R. Avila et al., Co-Immunoprecipitation of Membrane-Bound Receptors, *Arabidopsis Book*, 13, e0180, 2015.
- [495] T. Machleidt et al., NanoBRET-A Novel BRET Platform for the Analysis of Protein-Protein Interactions, *ACS Chem Biol*, 10, 1797-1804, 2015.
- [496] T. Katada, The inhibitory G protein G(i) identified as pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation, *Biol Pharm Bull*, 35, 2103-2111, 2012.

- [497] P. Sundd et al., Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings, *Mol Immunol*, 55, 59-69, 2013.
- [498] J. A. Monn et al., Synthesis, pharmacological characterization, and molecular modeling of heterobicyclic amino acids related to (+)-2-aminobicyclo[3.1.0] hexane-2,6-dicarboxylic acid (LY354740): identification of two new potent, selective, and systemically active agonists for group II metabotropic glutamate receptors, *J Med Chem*, 42, 1027-1040, 1999.
- [499] F. Acher et al., Metabotropic glutamate receptors in GtoPdb v.2023.1, *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*, 2023(1), 2023.
- [500] K. Hubner et al., Ca²⁺ dynamics correlates with phenotype and function in primary human neutrophils, *Biophys Chem*, 184, 116-125, 2013.
- [501] J. Hann et al., Calcium signaling and regulation of neutrophil functions: Still a long way to go, *J Leukoc Biol*, 107, 285-297, 2020.
- [502] D. B. Kuhns et al., Ca²⁺-dependent production and release of IL-8 in human neutrophils, *J Immunol*, 161, 4332-4339, 1998.
- [503] F. Watson & S. W. Edwards, Stimulation of primed neutrophils by soluble immune complexes: priming leads to enhanced intracellular Ca²⁺ elevations, activation of phospholipase D, and activation of the NADPH oxidase, *Biochem Biophys Res Commun*, 247, 819-826, 1998.
- [504] K. H. Krause et al., The calcium signal and neutrophil activation, *Clin Biochem*, 23, 159-166, 1990.
- [505] E. J. Pettit & M. B. Hallett, Two distinct Ca²⁺ storage and release sites in human neutrophils, *J Leukoc Biol*, 63, 225-232, 1998.
- [506] L. W. Chen & C. R. Jan, Mechanisms and modulation of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced Ca²⁺ mobilization in human neutrophils, *Int Immunopharmacol*, 1, 1341-1349, 2001.
- [507] R. A. Clemens & C. A. Lowell, Store-operated calcium signaling in neutrophils, *J Leukoc Biol*, 98, 497-502, 2015.
- [508] A. Sasaki, Umami: The Science and Lore of Healthy Eating, *Academy of Nutrition and Dietetics*, 1-23, 2017.
- [509] L. Cynober, Metabolism of Dietary Glutamate in Adults, *Ann Nutr Metab*, 73 Suppl 5, 5-14, 2018.

- [510] A. Battezzati et al., Oxidation of glutamic acid by the splanchnic bed in humans, *Am J Physiol*, 269, E269-276, 1995.
- [511] V. Dall'Asta et al., Pathways of L-glutamic acid transport in cultured human fibroblasts, *J Biol Chem*, 258, 6371-6379, 1983.
- [512] M. Watford, Glutamine and glutamate metabolism across the liver sinusoid, *J Nutr*, 130, 983S-987S, 2000.
- [513] E. S. Schmidt & F. W. Schmidt, Glutamate dehydrogenase: biochemical and clinical aspects of an interesting enzyme, *Clin Chim Acta*, 173, 43-55, 1988.
- [514] M. Frauli et al., Among the twenty classical L-amino acids, only glutamate directly activates metabotropic glutamate receptors, *Neuropharmacology*, 50, 245-253, 2006.
- [515] A. D. Radkov & L. A. Moe, Bacterial synthesis of D-amino acids, *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 5363-5374, 2014.
- [516] M. J. Cline & R. I. Lehrer, D-amino acid oxidase in leukocytes: a possible D-amino-acid-linked antimicrobial system, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 62, 756-763, 1969.
- [517] M. R. Eckstein et al., Amino acid oxidase of leukocytes in relation to H₂O₂-mediated bacterial killing, *J Clin Invest*, 50, 1985-1991, 1971.
- [518] L. R. DeChatelet et al., Amino acid oxidase in leukocytes: evidence against a major role in phagocytosis, *Infect Immun*, 5, 632-633, 1972.
- [519] J. Sasabe & M. Suzuki, Emerging Role of D-Amino Acid Metabolism in the Innate Defense, *Front Microbiol*, 9, 933, 2018.
- [520] Y. Irukayama-Tomobe et al., Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3930-3934, 2009.
- [521] A. Bassoli et al., The taste of D- and L-amino acids: In vitro binding assays with cloned human bitter (TAS2Rs) and sweet (TAS1R2/TAS1R3) receptors, *Food Chem*, 150, 27-33, 2014.
- [522] R. M. Carey et al., Taste receptor T1R3 in nasal cilia detects *Staphylococcus aureus* D-amino acids to enhance apical glucose uptake, *Preprint*, 2022.
- [523] M. R. Medapati et al., Bitter taste receptor T2R14 detects quorum sensing molecules from cariogenic *Streptococcus mutans* and mediates innate immune responses in gingival epithelial cells, *FASEB J*, 35, e21375, 2021.

- [524] S. Gil et al., Genotype-specific regulation of oral innate immunity by T2R38 taste receptor, *Mol Immunol*, 68, 663-670, 2015.
- [525] X. Zheng et al., Gingival solitary chemosensory cells are immune sentinels for periodontitis, *Nat Commun*, 10, 4496, 2019.
- [526] X. Zhu et al., Ingestion of bacterial lipopolysaccharide inhibits peripheral taste responses to sucrose in mice, *Neuroscience*, 258, 47-61, 2014.
- [527] S. Maurer et al., Tasting *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Human Neutrophils Express the Bitter Receptor T2R38 as Sensor for the Quorum Sensing Molecule N-(3-Oxododecanoyl)-L-Homoserine Lactone, *Front Immunol*, 6, 369, 2015.
- [528] I. Gopallawa et al., Bitter taste receptors stimulate phagocytosis in human macrophages through calcium, nitric oxide, and cyclic-GMP signaling, *Cell Mol Life Sci*, 78, 271-286, 2021.
- [529] B. M. Hariri et al., Flavones modulate respiratory epithelial innate immunity: Anti-inflammatory effects and activation of the T2R14 receptor, *J Biol Chem*, 292, 8484-8497, 2017.
- [530] A. Jaggupilli et al., Characterization of the Binding Sites for Bacterial Acyl Homoserine Lactones (AHLs) on Human Bitter Taste Receptors (T2Rs), *ACS Infect Dis*, 4, 1146-1156, 2018.
- [531] H. Dong et al., Oral Microbiota-Host Interaction Mediated by Taste Receptors, *Front Cell Infect Microbiol*, 12, 802504, 2022.
- [532] J. R. Freund et al., Activation of airway epithelial bitter taste receptors by *Pseudomonas aeruginosa* quinolones modulates calcium, cyclic-AMP, and nitric oxide signaling, *J Biol Chem*, 293, 9824-9840, 2018.
- [533] P. N. Jimenez et al., The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*, *Microbiol Mol Biol Rev*, 76, 46-65, 2012.
- [534] M. T. Holden et al., Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria, *Mol Microbiol*, 33, 1254-1266, 1999.
- [535] E. C. Pesci et al., Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11229-11234, 1999.
- [536] E. Deziel et al., Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-alkylquinolines (HAQs) reveals a role for 4-hydroxy-2-heptylquinoline in cell-to-cell communication, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 1339-1344, 2004.

- [537] R. Wilson et al., Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* phenazine pigments in sputum and assessment of their contribution to sputum sol toxicity for respiratory epithelium, *Infect Immun*, 56, 2515-2517, 1988.
- [538] D. G. Davies & C. N. Marques, A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms, *J Bacteriol*, 191, 1393-1403, 2009.
- [539] A. Koehl et al., Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors, *Nature*, 566, 79-84, 2019.
- [540] H. Shaye et al., Structural basis of the activation of a metabotropic GABA receptor, *Nature*, 584, 298-303, 2020.
- [541] C. Mao et al., Cryo-EM structures of inactive and active GABA(B) receptor, *Cell Res*, 30, 564-573, 2020.
- [542] J. M. Perez-Aguilar et al., Modeling and Structural Characterization of the Sweet Taste Receptor Heterodimer, *ACS Chem Neurosci*, 10, 4579-4592, 2019.
- [543] L. E. Limbird et al., Beta-adrenergic receptors: evidence for negative cooperativity, *Biochem Biophys Res Commun*, 64, 1160-1168, 1975.
- [544] J. C. Venter & C. M. Fraser, beta-Adrenergic receptor isolation and characterization with immobilized drugs and monoclonal antibodies, *Federation proceedings*, 42, 273-278, 1983.
- [545] T. E. Hebert et al., A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation, *J Biol Chem*, 271, 16384-16392, 1996.
- [546] F. Ciruela et al., Immunological identification of A1 adenosine receptors in brain cortex, *J Neurosci Res*, 42, 818-828, 1995.
- [547] E. Gracia et al., Homodimerization of adenosine A(1) receptors in brain cortex explains the biphasic effects of caffeine, *Neuropharmacology*, 71, 56-69, 2013.
- [548] G. Y. Ng et al., Dopamine D2 receptor dimers and receptor-blocking peptides, *Biochem Biophys Res Commun*, 227, 200-204, 1996.
- [549] L. T. Potter et al., Evidence of paired M2 muscarinic receptors, *Molecular Pharmacology*, 39, 211, 1991.
- [550] S. Avissar et al., Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 156-159, 1983.

- [551] J. T. Herberg et al., The hepatic glucagon receptor. Solubilization, characterization, and development of an affinity adsorption assay for the soluble receptor, *J Biol Chem*, 259, 9285-9294, 1984.
- [552] S. Cvejic & L. A. Devi, Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization, *J Biol Chem*, 272, 26959-26964, 1997.
- [553] L. Albizu et al., Heteromerization of G protein-coupled receptors: relevance to neurological disorders and neurotherapeutics, *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 636-650, 2010.
- [554] S. Gines et al., Dopamine D1 and adenosine A1 receptors form functionally interacting heteromeric complexes, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8606-8611, 2000.
- [555] R. Franco et al., Evidence for adenosine/dopamine receptor interactions: indications for heteromerization, *Neuropsychopharmacology*, 23, S50-59, 2000.
- [556] M. Torvinen et al., Interactions among adenosine deaminase, adenosine A(1) receptors and dopamine D(1) receptors in stably cotransfected fibroblast cells and neurons, *Neuroscience*, 113, 709-719, 2002.
- [557] J. Hillion et al., Coaggregation, cointernalization, and codesensitization of adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors, *J Biol Chem*, 277, 18091-18097, 2002.
- [558] M. Canals et al., Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer, *J Biol Chem*, 278, 46741-46749, 2003.
- [559] M. Torvinen et al., Biochemical identification of the dopamine D2 receptor domains interacting with the adenosine A2A receptor, *J Mol Neurosci*, 24, 173-180, 2004.
- [560] P. C. Chandrasekera et al., Adenosine A1 receptors heterodimerize with beta1- and beta2-adrenergic receptors creating novel receptor complexes with altered G protein coupling and signaling, *Cell Signal*, 25, 736-742, 2013.
- [561] J. Gonzalez-Maeso et al., Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis, *Nature*, 452, 93-97, 2008.
- [562] N. Cabello et al., Metabotropic glutamate type 5, dopamine D2 and adenosine A2a receptors form higher-order oligomers in living cells, *J Neurochem*, 109, 1497-1507, 2009.
- [563] J. L. Moreno et al., Identification of three residues essential for 5-hydroxytryptamine 2A-metabotropic glutamate 2 (5-HT2A.mGlu2) receptor heteromerization and its psychoactive behavioral function, *J Biol Chem*, 287, 44301-44319, 2012.

- [564] A. S. Hauser et al., Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications, *Nat Rev Drug Discov*, 16, 829-842, 2017.
- [565] M. Szlachta et al., Repeated Clozapine Increases the Level of Serotonin 5-HT(1A)R Heterodimerization with 5-HT(2A) or Dopamine D(2) Receptors in the Mouse Cortex, *Front Mol Neurosci*, 11, 40, 2018.
- [566] I. Gomes et al., Detection of Receptor Heteromerization Using In Situ Proximity Ligation Assay, *Curr Protoc Pharmacol*, 75, 2 16 11-12 16 31, 2016.
- [567] S. Ferré et al., Building a new conceptual framework for receptor heteromers, *Nat Chem Biol*, 5, 131-134, 2009.
- [568] M. C. Michel et al., How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies?, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 379, 385-388, 2009.
- [569] G. Riemekasten et al., What Makes Antibodies Against G Protein-Coupled Receptors so Special? A Novel Concept to Understand Chronic Diseases, *Front Immunol*, 11, 564526, 2020.
- [570] Y. Marchalant et al., Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody Specificity, *J Histochem Cytochem*, 62, 395-404, 2014.
- [571] M. Jo & S. T. Jung, Engineering therapeutic antibodies targeting G-protein-coupled receptors, *Exp Mol Med*, 48, e207, 2016.
- [572] Y. Liu et al., On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance, *Cell*, 165, 535-550, 2016.
- [573] C. Carmona-Rivera & M. J. Kaplan, Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity, *Semin Immunopathol*, 35, 455-463, 2013.
- [574] P. L. Raber et al., Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways, *Int J Cancer*, 134, 2853-2864, 2014.
- [575] J. Y. Sagiv et al., Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer, *Cell Rep*, 10, 562-573, 2015.
- [576] C. Silvestre-Roig et al., Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis, *Blood*, 127, 2173-2181, 2016.
- [577] P. Scapini et al., Human neutrophils in the saga of cellular heterogeneity: insights and open questions, *Immunol Rev*, 273, 48-60, 2016.

- [578] C. Rosales, Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types?, *Front Physiol*, 9, 113, 2018.
- [579] L. Dahl et al., Multiplexed selectivity screening of anti-GPCR antibodies, *Sci Adv*, 9, eadf9297, 2023.
- [580] J. A. Allen et al., Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling, *Nat Rev Neurosci*, 8, 128-140, 2007.
- [581] A. D. Goddard et al., Lipid-dependent GPCR dimerization, *Methods Cell Biol*, 117, 341-357, 2013.
- [582] S. Gahbauer & R. A. Bockmann, Membrane-Mediated Oligomerization of G Protein Coupled Receptors and Its Implications for GPCR Function, *Front Physiol*, 7, 494, 2016.
- [583] V. A. Villar et al., Localization and signaling of GPCRs in lipid rafts, *Methods Cell Biol*, 132, 3-23, 2016.
- [584] A. Francesconi et al., Regulation of group I metabotropic glutamate receptor trafficking and signaling by the caveolar/lipid raft pathway, *J Neurosci*, 29, 3590-3602, 2009.
- [585] S. E. Roh et al., Lipid rafts serve as signaling platforms for mGlu1 receptor-mediated calcium signaling in association with caveolin, *Mol Brain*, 7, 9, 2014.
- [586] L. Szidonya et al., Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: debated structures with established and emerging functions, *J Endocrinol*, 196, 435-453, 2008.
- [587] D. Fotiadis et al., Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes, *Nature*, 421, 127-128, 2003.
- [588] Y. Liang et al., Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes, *J Biol Chem*, 278, 21655-21662, 2003.
- [589] T. Rakshit et al., Rhodopsin Forms Nanodomains in Rod Outer Segment Disc Membranes of the Cold-Blooded *Xenopus laevis*, *PLoS One*, 10, e0141114, 2015.
- [590] A. M. Whited & P. S. Park, Nanodomain organization of rhodopsin in native human and murine rod outer segment disc membranes, *Biochim Biophys Acta*, 1848, 26-34, 2015.
- [591] P. S. Park, Rhodopsin Oligomerization and Aggregation, *J Membr Biol*, 252, 413-423, 2019.

- [592] M. R. Whorton et al., Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer, *J Biol Chem*, 283, 4387-4394, 2008.
- [593] T. Getter et al., Stereospecific modulation of dimeric rhodopsin, *FASEB J*, 33, 9526-9539, 2019.
- [594] M. Cottet et al., BRET and Time-resolved FRET strategy to study GPCR oligomerization: from cell lines toward native tissues, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3, 92, 2012.
- [595] A. Emami-Nemini et al., Time-resolved fluorescence ligand binding for G protein-coupled receptors, *Nat Protoc*, 8, 1307-1320, 2013.
- [596] I. Gomes et al., G Protein-Coupled Receptor Heteromers, *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56, 403-425, 2016.
- [597] C. Kuhn et al., Oligomerization of TAS2R bitter taste receptors, *Chem Senses*, 35, 395-406, 2010.
- [598] C. Kuhn & W. Meyerhof, Oligomerization of sweet and bitter taste receptors, *Methods Cell Biol*, 117, 229-242, 2013.
- [599] M. Behrens et al., Gustatory expression pattern of the human TAS2R bitter receptor gene family reveals a heterogenous population of bitter responsive taste receptor cells, *J Neurosci*, 27, 12630-12640, 2007.
- [600] R. Rozenfeld et al., Receptor heteromerization expands the repertoire of cannabinoid signaling in rodent neurons, *PLoS One*, 7, e29239, 2012.
- [601] S. Bulenger et al., Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation, *Trends Pharmacol Sci*, 26, 131-137, 2005.
- [602] M. McVey et al., Monitoring receptor oligomerization using time-resolved fluorescence resonance energy transfer and bioluminescence resonance energy transfer. The human delta -opioid receptor displays constitutive oligomerization at the cell surface, which is not regulated by receptor occupancy, *J Biol Chem*, 276, 14092-14099, 2001.
- [603] H. Issafras et al., Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors, *J Biol Chem*, 277, 34666-34673, 2002.
- [604] M. A. Ayoub et al., Monitoring of ligand-independent dimerization and ligand-induced conformational changes of melatonin receptors in living cells by bioluminescence resonance energy transfer, *J Biol Chem*, 277, 21522-21528, 2002.

- [605] G. J. Babcock et al., Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor, *J Biol Chem*, 278, 3378-3385, 2003.
- [606] P. J. Harding et al., Constitutive dimerization of the G-protein coupled receptor, neurotensin receptor 1, reconstituted into phospholipid bilayers, *Biophys J*, 96, 964-973, 2009.
- [607] T. Wurch et al., Agonist-independent and -dependent oligomerization of dopamine D(2) receptors by fusion to fluorescent proteins, *FEBS Lett*, 507, 109-113, 2001.
- [608] S. Terrillon et al., Oxytocin and vasopressin V1a and V2 receptors form constitutive homo- and heterodimers during biosynthesis, *Mol Endocrinol*, 17, 677-691, 2003.
- [609] A. Salahpour et al., Homodimerization of the beta2-adrenergic receptor as a prerequisite for cell surface targeting, *J Biol Chem*, 279, 33390-33397, 2004.
- [610] M. Margeta-Mitrovic et al., A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization, *Neuron*, 27, 97-106, 2000.
- [611] M. Gassmann et al., The RXR-type endoplasmic reticulum-retention/retrieval signal of GABAB1 requires distant spacing from the membrane to function, *Mol Pharmacol*, 68, 137-144, 2005.
- [612] J. Park et al., Structural architecture of a dimeric class C GPCR based on co-trafficking of sweet taste receptor subunits, *J Biol Chem*, 294, 4759-4774, 2019.
- [613] C. Hague et al., Cell surface expression of alpha1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with alpha1B-adrenergic receptors, *J Biol Chem*, 279, 15541-15549, 2004.
- [614] H. L. Wang et al., Heterodimerization of opioid receptor-like 1 and mu-opioid receptors impairs the potency of micro receptor agonist, *J Neurochem*, 92, 1285-1294, 2005.
- [615] G. Servant & E. Frerot, Pharmacology of the Umami Taste Receptor, In *The Pharmacology of Taste* (Palmer, R. K., and Servant, G., Eds.), pp 109-136, Springer International Publishing, Cham, 2022.
- [616] N. J. Smith et al., Critically evaluating sweet taste receptor expression and signaling through a molecular pharmacology lens, *FEBS J*, 288, 2660-2672, 2021.
- [617] N. Zhang et al., Typical Umami Ligand-Induced Binding Interaction and Conformational Change of T1R1-VFT, *J Agric Food Chem*, 70, 11652-11666, 2022.
- [618] P. J. Kammermeier et al., Specificity of metabotropic glutamate receptor 2 coupling to G proteins, *Mol Pharmacol*, 63, 183-191, 2003.

- [619] M. Ozeck et al., Receptors for bitter, sweet and umami taste couple to inhibitory G protein signaling pathways, *Eur J Pharmacol*, 489, 139-149, 2004.
- [620] C. Harrison & J. R. Traynor, The [³⁵S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology, *Life Sci*, 74, 489-508, 2003.
- [621] G. Andersen et al., [6]-Gingerol Facilitates CXCL8 Secretion and ROS Production in Primary Human Neutrophils by Targeting the TRPV1 Channel, *Mol Nutr Food Res*, 67, e2200434, 2023.
- [622] K. Önnheim et al., A novel receptor cross-talk between the ATP receptor P2Y2 and formyl peptide receptors reactivates desensitized neutrophils to produce superoxide, *Exp Cell Res*, 323, 209-217, 2014.
- [623] B. McCormick et al., Cross-talk between Rho GTPases and PI3K in the neutrophil, *Small GTPases*, 10, 187-195, 2019.
- [624] S. Mol et al., Efficient Neutrophil Activation Requires Two Simultaneous Activating Stimuli, *Int J Mol Sci*, 22, 2021.
- [625] L. Iacovelli et al., Regulation of group II metabotropic glutamate receptors by G protein-coupled receptor kinases: mGlu2 receptors are resistant to homologous desensitization, *Mol Pharmacol*, 75, 991-1003, 2009.
- [626] N. Abreu et al., Mechanisms of differential desensitization of metabotropic glutamate receptors, *Cell Rep*, 35, 109050, 2021.
- [627] R. Pacheco et al., Glutamate released by dendritic cells as a novel modulator of T cell activation, *J Immunol*, 177, 6695-6704, 2006.
- [628] Y. Ganor et al., Human T cells express a functional ionotropic glutamate receptor GluR3, and glutamate by itself triggers integrin-mediated adhesion to laminin and fibronectin and chemotactic migration, *J Immunol*, 170, 4362-4372, 2003.
- [629] Y. Ganor et al., TCR activation eliminates glutamate receptor GluR3 from the cell surface of normal human T cells, via an autocrine/paracrine granzyme B-mediated proteolytic cleavage, *J Immunol*, 178, 683-692, 2007.
- [630] R. S. Lewis, Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes, *Annu Rev Immunol*, 19, 497-521, 2001.
- [631] J. F. Singh et al., Blood bioamines, cortisol and aminoacid levels in leukemic patients, *Indian J Cancer*, 26, 222-226, 1989.
- [632] Y. Xiao et al., Targeting Glutamine Metabolism as an Attractive Therapeutic Strategy for Acute Myeloid Leukemia, *Curr Treat Options Oncol*, 2023.

- [633] T. McNearney et al., Excitatory amino acid profiles of synovial fluid from patients with arthritis, *J Rheumatol*, 27, 739-745, 2000.
- [634] S. Flood et al., Modulation of interleukin-6 and matrix metalloproteinase 2 expression in human fibroblast-like synoviocytes by functional ionotropic glutamate receptors, *Arthritis Rheum*, 56, 2523-2534, 2007.
- [635] J. Fazzari et al., Inhibitors of glutamate release from breast cancer cells; new targets for cancer-induced bone-pain, *Sci Rep*, 5, 8380, 2015.
- [636] H. Yi et al., Glutamate in cancers: from metabolism to signaling, *J Biomed Res*, 34, 260-270, 2020.
- [637] L. J. Yu et al., Metabotropic glutamate receptors in cancer, *Neuropharmacology*, 115, 193-202, 2017.
- [638] S. Koda et al., The role of glutamate receptors in the regulation of the tumor microenvironment, *Front Immunol*, 14, 1123841, 2023.
- [639] V. Neugebauer et al., Synaptic plasticity in the amygdala in a model of arthritic pain: differential roles of metabotropic glutamate receptors 1 and 5, *J Neurosci*, 23, 52-63, 2003.
- [640] M. Mazzitelli & V. Neugebauer, Amygdala group II mGluRs mediate the inhibitory effects of systemic group II mGluR activation on behavior and spinal neurons in a rat model of arthritis pain, *Neuropharmacology*, 158, 107706, 2019.
- [641] O. Kopach et al., Human neutrophils communicate remotely via glutamate-induced glutamate release, *iScience*, 2023.
- [642] S. A. Adibi & D. W. Mercer, Protein digestion in human intestine as reflected in luminal, mucosal, and plasma amino acid concentrations after meals, *J Clin Invest*, 52, 1586-1594, 1973.
- [643] D. Yan, Protection of the glutamate pool concentration in enteric bacteria, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9475-9480, 2007.
- [644] A. M. Mowat, Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens, *Nat Rev Immunol*, 3, 331-341, 2003.
- [645] A. A. Bachmanov et al., Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice, *Chem Senses*, 26, 905-913, 2001.

- [646] P. Jiang et al., Identification of the cyclamate interaction site within the transmembrane domain of the human sweet taste receptor subunit T1R3, *J Biol Chem*, 280, 34296-34305, 2005.
- [647] H. Biermann et al., Murine leukocytes with ring-shaped nuclei include granulocytes, monocytes, and their precursors, *J Leukoc Biol*, 65, 217-231, 1999.
- [648] E. B. Eruslanov et al., Mouse versus Human Neutrophils in Cancer: A Major Knowledge Gap, *Trends Cancer*, 3, 149-160, 2017.
- [649] J. L. Gao & P. M. Murphy, Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains, *Journal of Biological Chemistry*, 268, 25395-25401, 1993.
- [650] S. K. Green et al., Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*, *Appl Microbiol*, 28, 987-991, 1974.
- [651] M. W. Ferguson et al., Comparison of the *exoS* gene and protein expression in soil and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Infect Immun*, 69, 2198-2210, 2001.
- [652] K. D. Mena & C. P. Gerba, Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water, *Rev Environ Contam Toxicol*, 201, 71-115, 2009.
- [653] M. Haenni et al., Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France, *BMC Vet Res*, 11, 9, 2015.
- [654] M. F. Moradali et al., *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence, *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 39, 2017.
- [655] S. K. Remold et al., Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes, *Microb Ecol*, 62, 505-517, 2011.
- [656] G. P. Bodey et al., Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, *Rev Infect Dis*, 5, 279-313, 1983.
- [657] R. S. Baltimore et al., Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration, *Am Rev Respir Dis*, 140, 1650-1661, 1989.
- [658] C. Koch & N. Hoiby, Pathogenesis of cystic fibrosis, *Lancet*, 341, 1065-1069, 1993.
- [659] D. S. Hooi et al., Differential immune modulatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules, *Infect Immun*, 72, 6463-6470, 2004.
- [660] T. Strateva & I. Mitov, Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Annals of Microbiology*, 61, 717-732, 2011.

- [661] M. E. Davey & A. O'Toole G, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 847-867, 2000.
- [662] G. M. Hänsch et al., The Pseudomonas quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils, *J Appl Biomater Funct Mater*, 12, 21-26, 2014.
- [663] P. S. Stewart & J. W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet*, 358, 135-138, 2001.
- [664] E. Drenkard & F. M. Ausubel, Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation, *Nature*, 416, 740-743, 2002.
- [665] M. Valentini et al., Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa, *Curr Opin Microbiol*, 41, 15-20, 2018.
- [666] M. Schuster et al., Identification, timing, and signal specificity of Pseudomonas aeruginosa quorum-controlled genes: a transcriptome analysis, *J Bacteriol*, 185, 2066-2079, 2003.
- [667] J. Lee & L. Zhang, The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa, *Protein Cell*, 6, 26-41, 2015.
- [668] Q. Li et al., The Molecular Architecture of Pseudomonas aeruginosa Quorum-Sensing Inhibitors, *Mar Drugs*, 20, 2022.
- [669] J. Lin et al., The Pseudomonas Quinolone Signal (PQS): Not Just for Quorum Sensing Anymore, *Front Cell Infect Microbiol*, 8, 230, 2018.
- [670] F. F. Tuon et al., Pathogenesis of the Pseudomonas aeruginosa Biofilm: A Review, *Pathogens*, 11, 2022.
- [671] S. L. Drees & S. Fetzner, PqsE of Pseudomonas aeruginosa Acts as Pathway-Specific Thioesterase in the Biosynthesis of Alkylquinolone Signaling Molecules, *Chem Biol*, 22, 611-618, 2015.
- [672] E. DiMango et al., Diverse Pseudomonas aeruginosa gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8, *J Clin Invest*, 96, 2204-2210, 1995.
- [673] R. S. Smith et al., IL-8 production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the Pseudomonas autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF-kappa B and activator protein-2, *J Immunol*, 167, 366-374, 2001.

- [674] S. Zimmermann et al., Induction of neutrophil chemotaxis by the quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, *Infect Immun*, 74, 5687-5692, 2006.
- [675] C. Wagner et al., The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN), *Anal Bioanal Chem*, 387, 481-487, 2007.
- [676] K. Tateda et al., The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils, *Infect Immun*, 71, 5785-5793, 2003.
- [677] E. K. Shiner et al., *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer modulates host cell responses through calcium signalling, *Cell Microbiol*, 8, 1601-1610, 2006.
- [678] A. J. Ritchie et al., Modification of in vivo and in vitro T- and B-cell-mediated immune responses by the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, *Infect Immun*, 71, 4421-4431, 2003.
- [679] A. J. Ritchie et al., The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation, *Infect Immun*, 73, 1648-1655, 2005.
- [680] G. Telford et al., The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity, *Infect Immun*, 66, 36-42, 1998.
- [681] K. Kim et al., Global gene expression analysis on the target genes of PQS and HHQ in J774A.1 monocyte/macrophage cells, *Microb Pathog*, 49, 174-180, 2010.
- [682] M. E. Skindersoe et al., *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecules interfere with dendritic cell-induced T-cell proliferation, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 55, 335-345, 2009.
- [683] Y. C. Liu et al., Modulation of Host Biology by *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Signal Molecules: Messengers or Traitors, *Front Microbiol*, 6, 1226, 2015.
- [684] A. Zaborin et al., *Pseudomonas aeruginosa* overrides the virulence inducing effect of opioids when it senses an abundance of phosphate, *PLoS One*, 7, e34883, 2012.
- [685] E. Frimmersdorf et al., How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach, *Environ Microbiol*, 12, 1734-1747, 2010.
- [686] V. M. Patil et al., Screening of different *Pseudomonas* and *Bacillus* Spp. for production of L-glutamic acid and impact of their cell-free filtrate on growth and yield of brinjal (*Solanum melongena*), *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7, 14-18, 2019.

- [687] Y. Yu et al., Poly-gamma-Glutamic Acids Contribute to Biofilm Formation and Plant Root Colonization in Selected Environmental Isolates of *Bacillus subtilis*, *Front Microbiol*, 7, 1811, 2016.
- [688] A. S. Doré et al., Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain, *Nature*, 511, 557-562, 2014.
- [689] D. A. Colosimo et al., Mapping Interactions of Microbial Metabolites with Human G-Protein-Coupled Receptors, *Cell Host Microbe*, 26, 273-282 e277, 2019.
- [690] A. M. Valdes et al., Role of the gut microbiota in nutrition and health, *BMJ*, 361, k2179, 2018.
- [691] A. S. Husted et al., GPCR-Mediated Signaling of Metabolites, *Cell Metab*, 25, 777-796, 2017.
- [692] Q. Pu et al., Bitter receptor TAS2R138 facilitates lipid droplet degradation in neutrophils during *Pseudomonas aeruginosa* infection, *Signal Transduct Target Ther*, 6, 210, 2021.
- [693] R. J. Lee et al., T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection, *J Clin Invest*, 122, 4145-4159, 2012.
- [694] C. Verbeurgt et al., The human bitter taste receptor T2R38 is broadly tuned for bacterial compounds, *PLoS One*, 12, e0181302, 2017.
- [695] R. J. Lee et al., Mouse nasal epithelial innate immune responses to *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecules require taste signaling components, *Innate Immun*, 20, 606-617, 2014.
- [696] M. R. Medapati et al., Bitter Taste Receptor T2R14 Modulates Gram-Positive Bacterial Internalization and Survival in Gingival Epithelial Cells, *Int J Mol Sci*, 22, 2021.
- [697] R. M. Carey et al., Sinonasal T2R-mediated nitric oxide production in response to *Bacillus cereus*, *Am J Rhinol Allergy*, 31, 211-215, 2017.
- [698] N. Lee et al., A pathogen-derived metabolite induces microglial activation via odorant receptors, *FEBS J*, 287, 3841-3870, 2020.
- [699] A. Nishida et al., Gut microbial short-chain fatty acids-mediated olfactory receptor 78 stimulation promotes anorexigenic gut hormone peptide YY secretion in mice, *Biochem Biophys Res Commun*, 557, 48-54, 2021.
- [700] A. Kumar et al., CXCR4 physically associates with the T cell receptor to signal in T cells, *Immunity*, 25, 213-224, 2006.

- [701] Y. Masubuchi et al., A novel regulatory function of sweet taste-sensing receptor in adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells, *PLoS One*, 8, e54500, 2013.
- [702] M. Zopun et al., Human Sweet Receptor T1R3 is Functional in Human Gastric Parietal Tumor Cells (HGT-1) and Modulates Cyclamate and Acesulfame K-Induced Mechanisms of Gastric Acid Secretion, *J Agric Food Chem*, 66, 4842-4852, 2018.
- [703] N. Dubovski et al., Sensitivity of human sweet taste receptor subunits T1R2 and T1R3 to activation by glucose enantiomers, *Chem Senses*, 48, 2023.
- [704] R. M. Carey et al., Taste receptor T1R3 in nasal cilia detects *Staphylococcus aureus* D-amino acids to increase apical glucose uptake and enhance innate immunity, *bioRxiv [Preprint]*, [cited 07.07.2023], 2023.
- [705] S. Häussler & T. Becker, The pseudomonas quinolone signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations, *PLoS Pathog*, 4, e1000166, 2008.
- [706] S. Q. An & J. L. Tang, Diffusible signal factor signaling regulates multiple functions in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*, *BMC Res Notes*, 11, 569, 2018.
- [707] E. Alcaraz et al., The rpf/DSF signalling system of *Stenotrophomonas maltophilia* positively regulates biofilm formation, production of virulence-associated factors and beta-lactamase induction, *FEMS Microbiol Lett*, 366, 2019.
- [708] C. Boon et al., A novel DSF-like signal from *Burkholderia cenocepacia* interferes with *Candida albicans* morphological transition, *ISME J*, 2, 27-36, 2008.
- [709] Y. Deng et al., Differential modulation of *Burkholderia cenocepacia* virulence and energy metabolism by the quorum-sensing signal BDSF and its synthase, *J Bacteriol*, 191, 7270-7278, 2009.
- [710] R. P. Ryan et al., Intraspecies signaling involving the diffusible signal factor BDSF (cis-2-dodecenoic acid) influences virulence in *Burkholderia cenocepacia*, *J Bacteriol*, 191, 5013-5019, 2009.
- [711] Y. Deng et al., Structural and functional characterization of diffusible signal factor family quorum-sensing signals produced by members of the *Burkholderia cepacia* complex, *Appl Environ Microbiol*, 76, 4675-4683, 2010.
- [712] C. Masanetz & W. Grosch, Hay-like off-flavour of dry parsley, *Z Lebensm Unters Forsch*, 206, 114-120, 1998.
- [713] C. Masanetz et al., Fishy and hay-like off-flavours of dry spinach, *Z Lebensm Unters Forsch*, 206, 108-113, 1998.

- [714] T. Jagella & W. Grosch, Flavour and off-flavour compounds of black and white pepper (*Piper nigrum* L.), *European Food Research and Technology*, 209, 22-26, 1999.
- [715] M. Rychlik & J. O. Bosset, Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese. Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies, *International Dairy Journal*, 11, 903-910, 2001.
- [716] H. Widen et al., Identification of chemicals, possibly originating from misuse of refillable PET bottles, responsible for consumer complaints about off-odours in water and soft drinks, *Food Addit Contam*, 22, 681-692, 2005.
- [717] A. Strube et al., Characterization and identification of a plastic-like off-odor in mineral water, *Water Supply*, 9, 299-309, 2009.
- [718] T. Nielsen et al., The origin of off-odours in packaged rucola (*Eruca sativa*), *Food Chem*, 110, 96-105, 2008.
- [719] M. T. Lisanti et al., Earthy off-flavour in wine: evaluation of remedial treatments for geosmin contamination, *Food Chem*, 154, 171-178, 2014.
- [720] N. Müller & D. Rauhut, Recent Developments on the Origin and Nature of Reductive Sulfurous Off-Odours in Wine, *Fermentation*, 4, 2018.
- [721] K. G. Grunert, Food quality and safety: consumer perception and demand, *European Review of Agricultural Economics*, 32, 369-391, 2005.
- [722] G. K. Mishra et al., Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors, *Foods*, 7, 2018.
- [723] J. Castillo et al., Biosensors for life quality, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 102, 179-194, 2004.
- [724] D. M. Goodwin et al., Graphene Bioelectronic Nose for the Detection of Odorants with Human Olfactory Receptor 2AG1, *Chemosensors*, 9, 2021.
- [725] M. Marrakchi et al., A new concept of olfactory biosensor based on interdigitated microelectrodes and immobilized yeasts expressing the human receptor OR17-40, *Eur Biophys J*, 36, 1015-1018, 2007.
- [726] Q. Liu et al., Olfactory mucosa tissue-based biosensor: A bioelectronic nose with receptor cells in intact olfactory epithelium, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 146, 527-533, 2010.
- [727] Q. Liu et al., Olfactory cell-based biosensor: a first step towards a neurochip of bioelectronic nose, *Biosens Bioelectron*, 22, 318-322, 2006.

- [728] M. Son et al., Real-time monitoring of geosmin and 2-methylisoborneol, representative odor compounds in water pollution using bioelectronic nose with human-like performance, *Biosens Bioelectron*, 74, 199-206, 2015.
- [729] S. J. Park et al., Real-time monitoring of geosmin based on an aptamer-conjugated graphene field-effect transistor, *Biosens Bioelectron*, 174, 112804, 2021.
- [730] A. Patel & P. Peralta-Yahya, Olfactory Receptors as an Emerging Chemical Sensing Scaffold, *Biochemistry*, 62, 187-195, 2023.
- [731] E. A. Yasi et al., Rapid Deorphanization of Human Olfactory Receptors in Yeast, *Biochemistry*, 58, 2160-2166, 2019.
- [732] C. Verbeurgt et al., Profiling of olfactory receptor gene expression in whole human olfactory mucosa, *PLoS One*, 9, e96333, 2014.
- [733] Tom E. Garrison & Troy L. Best, *Dipodomys ordii*, *Mammalian Species*, 1990.
- [734] M. P. Sipos et al., Graminivory by *Dipodomys ordii* and *Dipodomys merriami* on Four Species of Perennial Grasses, *The Southwestern Naturalist*, 47, 276-281, 2002.
- [735] K. Schmidt-Nielsen & B. Schmidt-Nielsen, Water metabolism of desert mammals, *Physiol Rev*, 32, 135-166, 1952.
- [736] T. J. Orr et al., Cacti supply limited nutrients to a desert rodent community, *Oecologia*, 178, 1045-1062, 2015.
- [737] R. J. Kass, Demographic monitoring of Wright fishhook cactus, *Proceedings RMRS.*, 51, 1998.
- [738] P. G. Becher et al., Developmentally regulated volatiles geosmin and 2-methylisoborneol attract a soil arthropod to *Streptomyces* bacteria promoting spore dispersal, *Nat Microbiol*, 5, 821-829, 2020.
- [739] G. P Bell, Birds and mammals on an insect diet: a primer on diet composition analysis in relation to ecological energetics, *Studies in avian biology*, 13, 1990.
- [740] Ana D. Davidson & David C. Lightfoot, Interactive effects of keystone rodents on the structure of desert grassland arthropod communities, *Ecography*, 30, 515-525, 2007.
- [741] H. D. Rijksen & E. Meijaard, Ecology and Natural History, In *Our Vanishing Relative: The Status of Wild Orang-Utans at the Close of the Twentieth Century*, pp 65-108, Springer Dordrecht, 1999.
- [742] C. P. Van Schaik et al., Orangutan cultures revisited, In *Orangutans*, pp 299-310, 2008.

- [743] L. Peixoto et al., Olfactory sensitivity for mold-associated odorants in CD-1 mice and spider monkeys, *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, 204, 821-833, 2018.
- [744] S. Liu et al., Population genomics reveal recent speciation and rapid evolutionary adaptation in polar bears, *Cell*, 157, 785-794, 2014.
- [745] D. C. Rinker et al., Polar bear evolution is marked by rapid changes in gene copy number in response to dietary shift, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 116, 13446-13451, 2019.
- [746] M. V. Lomolino & M. L. Rosenzweig, Species Diversity in Space and Time, *The Journal of Wildlife Management*, 60, 1996.
- [747] P. A. Green et al., Respiratory and olfactory turbinal size in canid and arctoid carnivorans, *J Anat*, 221, 609-621, 2012.
- [748] J. L. Gittleman, Carnivore olfactory bulb size: allometry, phylogeny and ecology, *Journal of Zoology*, 225, 253-272, 2009.
- [749] N. W. Pilfold et al., Migratory response of polar bears to sea ice loss: to swim or not to swim, *Ecography*, 40, 189-199, 2016.
- [750] J. K. Shin et al., Downstream Transport of Geosmin Based on Harmful Cyanobacterial Outbreak Upstream in a Reservoir Cascade, *Int J Environ Res Public Health*, 19, 2022.
- [751] B. Jeong Hwan et al., Study of the cause of the generation of odor compounds (geosmin and 2-methylisoborneol) in the Han River system, the drinking water source, Republic of Korea, *Water Supply*, 23, 1081-1093, 2023.
- [752] C. Espinosa et al., Driving Factors of Geosmin Appearance in a Mediterranean River Basin: The Ter River Case, *Front Microbiol*, 12, 741750, 2021.
- [753] L. Tosi & C. Sola, Role of Geosmin, a Typical Inland Water Odour, in Guiding Glass Eel *Anguilla anguilla* (L.) Migration, *Ethology*, 95, 177-185, 2010.