

1. Einleitung

Gene für olfaktorische Rezeptoren (OR) sind auf fast allen Chromosomen des Menschen zu finden und gehören zu den größten Multigenfamilien der Säugetiere. Diese Gene wurden bevorzugt in sogenannten Clustern gefunden. Einer dieser OR-Cluster befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der Nähe des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (MHC, beim Menschen HLA-Komplex). Der Zusammenhang von MHC und Körpergeruch ist im Tierreich schon seit langem bekannt. Bei Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, daß die Partnerwahl durch eine MHC-abhängige Geruchskomponente beeinflusst wird. Auch beim Menschen scheinen HLA-abhängige Körperdüfte eine Rolle bei der gegenseitigen Anziehung oder Ablehnung zu spielen, wobei Individuen mit HLA-differenten Haplotypen als attraktiver empfunden werden als solche mit ähnlichen HLA-Antigenen. Dieses Verhalten könnte entwickelt worden sein, um bevorzugt HLA-heterozygote Nachkommen zu zeugen, die eine effektivere Immunabwehr gegen Krankheitserreger besitzen als HLA-homozygote Nachkommen.

Das hier beschriebene Projekt hat zum Ziel, die mögliche Beteiligung von HLA-gekoppelten OR Genen an der geruchsvermittelten zwischenmenschlichen Anziehung zu untersuchen. Da OR Gene auch von männlichen Keimzellen exprimiert werden, könnten sie nicht nur im Rahmen der Partnerwahl, sondern auch bei der Fortpflanzung eine wichtige Rolle spielen.

1.1. Der Geruchssinn

Für die meisten Tiere ist der olfaktorische Sinn in vielen Lebensbereichen der primäre und mit Abstand wichtigste in der sozialen Kommunikation: Sie analysieren damit die Qualität von Futter, identifizieren Feinde und sie benötigen ihn, um Paarungspartner zu finden (Doty, 1986). Mit eigenen Duftmarken, Ausscheidungen und Ausdünstungen machen sie auf ihre Präsenz und ihr Befinden aufmerksam, und in vielen Fällen ist ihr Verhalten vorrangig geprägt von der Wahrnehmung fremder und der Verbreitung eigener Geruchssignale. Die Leistungsfähigkeit des Geruchssinnes beim Menschen ist, verglichen mit der vieler anderer Säugetiere, eher gering. Der bessere Geruchssinn vieler Tiere bedeutet jedoch nicht unbedingt, daß der Mensch weniger olfaktorische Qualitäten unterscheiden kann, sondern eine höhere Konzentration der jeweiligen Moleküle notwendig ist, um den Geruch wahrzunehmen (Axel, 1995). In der heutigen zivilisierten Welt haben die Gerüche meist einen emotionalen Charakter oder werden ästhetisch bewertet. Mehr als jeder andere, stimuliert der olfaktorische Sinn Emotionen und Gefühle. Dies wird allein schon durch die Werbung für Parfum deutlich, die fast immer mit Liebe und Sexualität verbunden ist. Auch wenn sehr viele Düfte bewußt wahrgenommen werden, wirken viele auch auf das Unterbewußtsein: Sie regen Gedanken an oder rufen Erinnerungen hervor. Das Sympathie- oder Antipathieempfinden gegenüber anderen Personen scheint maßgeblich durch den Geruch mitbestimmt zu werden. In dem Ausspruch des Volksmundes, "man könne einen anderen nicht

riechen" kommt dies eindrucksvoll zur Geltung. Wie wichtig der Geruch für zwischenmenschliche Beziehungen ist, verdeutlicht auch ein Zitat aus Patrick Süskind's großartigem Roman "Das Parfum": Als die Amme das Waisenkind Jean-Baptiste Grenouille an den Pater des Klosters zurückgeben möchte, sagt sie: "Ich weiß nur eins: daß mich vor diesem Säugling graust, weil er nicht riecht."

1.2. Anatomie und Informationsfluß im Olfaktorischen System

Die Nasenhöhle des Menschen wird durch eine Scheidewand, das Nasenseptum, in einen linken und einen rechten Raum gegliedert. Die freie Oberfläche der beiden Räume wird durch Wülste, Conchen genannt, vergrößert, die von den Außenwänden in den Innenraum vorspringen. Die gesamte Nasenhöhle ist mit Schleimhaut ausgekleidet, wovon der größte Teil dem Befeuchten und Erwärmen der Atemluft dient. Nur ein kleiner Teil dieser Schleimhaut beinhaltet Riechsinneszellen (Sharon et al., 2000). Bei Säugetieren sind zwei anatomisch und funktionell unterschiedliche Organe in der Nasenhöhle bekannt, die olfaktorische Reize aufnehmen können: Das olfaktorische Epithel (MOE: Main olfactory epithelium) und das Vomeronasalorgan (VNO). (Wenn im Rahmen dieser Arbeit von Riechepithel gesprochen wird, ist immer das MOE gemeint). Das MOE dient hauptsächlich der bewußten Aufnahme von Gerüchen aus der Umgebung (Zhao et al., 1998), obwohl dieses Prinzip nicht als absolut anzusehen ist (Matsunami and Buck, 1997). Das VNO dagegen interagiert wahrscheinlich vorzugsweise mit Pheromonen, was letztendlich in Verhaltensweisen resultiert, die unbewußt gesteuert werden (Wysocki, 1989; Leinders-Zufall et al., 2000). Beim Menschen befindet sich das MOE im oberen Teil der Nasenhöhle und nimmt ca. 5 cm² ein; das VNO liegt im unteren Teil der Nasenhöhle und ist ca. 1-2 mm² groß. Lange Zeit hielt man das VNO beim Menschen für ein rudimentäres Organ, aber inzwischen gibt es Hinweise, daß das VNO doch noch eine Funktion besitzen könnte (Berliner et al., 1996). Im Riechepithel befinden sich Millionen von Sinnesnervenzellen, die zwischen langgestreckten Stützzellen eingebettet sind. Sie werden lebenslang aus neuronalen Stammzellen, den sogenannten Basalzellen, neu gebildet. Dies ist eine Besonderheit, denn die meisten Nervenzellen eines Organismus, die absterben, werden nicht ersetzt. Bei den Riechsinneszellen handelt es sich um bipolare Neurone, wobei das fortführende Axon in das Gehirn und der Dendrit in die Nasenhöhle projiziert. Die Dendriten weisen am Terminus ein Büschel von Cilien auf (Axel, 1995; O'Leary et al., 1999), die olfaktorische Rezeptoren tragen. Diese Rezeptoren sind Proteine mit 7 Transmembran Domänen (Buck and Axel, 1991), die Geruchsmoleküle in der Atemluft erkennen. Die olfaktorischen Rezeptoren (OR) aktivieren nach der Bindung eines passenden Geruchsmoleküles ein G-Protein und leiten somit ein Signal in das jeweilige Neuron. Es gibt viele Hinweise darauf, daß ein einzelnes Neuron nur einen definierten Rezeptortyp exprimiert (Boekhoff et al., 1990; Ronnett et al., 1993; Strachan and Raed, 1996; Janeway and Travers, 1997), d.h. nur ein Allel des jeweiligen Gens wird transkribiert (Chess et al., 1994). Alle Neurone, die jeweils den gleichen Rezeptor exprimieren, befinden sich in einer von vier definierten Zonen des Riechepithels. Innerhalb dieser Zonen scheinen sie zufällig

verteilt zu sein (Boekhoff et al., 1990; Ronnett et al., 1993; Strotmann et al., 1994). Die Axone der MOE-Neurone ziehen durch das Siebbein in den Riechkolben. Dort enden sie in den Glomeruli, wo sie erstmals synaptische Verbindungen mit fortführenden Neuronen bilden. Besonders bemerkenswert ist dabei, daß alle Axone von Sinneszellen mit identischen Rezeptoren auf meist zwei von ~1800 Glomeruli konvergieren (Vassar et al., 1994; Ressler et al., 1994b; Mombaerts et al., 1996). Das Konvergenzmuster ist absolut und invariant bei allen Individuen einer Spezies, woraus folgt, daß bei einem bestimmten Glomerulus im Riechkolben nur Signale umgeschaltet werden, die von der Aktivierung identischer olfaktorischer Rezeptoren herrühren (Wang et al., 1998; Malnic et al., 1999). Weniger eindeutig ist die Geruchsspezifität der Rezeptoren, d.h. einzelne OR werden von verschiedenen Geruchsstoffen aktiviert (Jones and Reed, 1989; Restrepo et al., 1990; Sato et al., 1994; Okada et al., 1994; Brunet et al., 1996; Friedrich and Korsching, 1997; Malnic et al., 1999). Umgekehrt kann auch ein Geruchsstoff mehrere OR Typen anregen (Malnic et al., 1999), wobei jedoch der Schwellenwert für die Signaltransduktion bei verschiedenen OR/Geruchsstoff-Kombinationen in weiten Bereichen variiert. Zusammenfassend kann man sagen, daß die olfaktorische Information zunächst grob in den verschiedenen Zonen der Riechschleimhaut entschlüsselt wird, indem nur eine bestimmte Kombination von Riechsinneszellen angeregt wird. Anschließend wird im Riechkolben durch ein bestimmtes Erregungsmuster der Glomeruli eine topographische Karte für den jeweiligen Geruchsstoff angelegt. Nach der ersten zentralen Schaltstelle im Riechkolben wird die Geruchsinformation an andere Hirnareale wie z.B. den olfaktorischen Cortex weitergegeben (Scott et al., 1993), wo wahrscheinlich die bewußte Wahrnehmung stattfindet. Wie die sensorische Information dort weiterverarbeitet wird, ist noch unklar. Projektionen auf limbische Hirnareale und den Hypothalamus scheinen jedoch für unbewußte Geruchswahrnehmungen wichtig zu sein (Malnic et al., 1999). Sie können bei unangenehmen oder sogar giftigen Gerüchen u.a. Schutzreflexe, wie z.B. Niesen und Würgen auslösen.

Die fortführenden Axone des VNO, das jedoch nur bei Tieren innerviert ist, projizieren in den akzessorischen Riechkolben, der auf der dorsalen Seite des Riechkolbens liegt. Von dort aus ziehen die Axone in die Amygdala und den Hypothalamus, wodurch endokrine Reaktionen auf Gerüche erklärt werden können (Matsunami and Buck, 1997; Keverne, 1999).

1.3. Struktur von Olfaktorischen Rezeptoren und ihrer Gene

Gene für OR wurden erstmals 1991 nachgewiesen (Buck and Axel, 1991). OR bestehen aus sieben Transmembran (TM) Domänen, gehören zur Superfamilie der G-gekoppelten Rezeptoren und lassen sich in vier verschiedene Familien einteilen. Die MOE Familie, die im Haupt-Riechepithel exprimiert wird, besteht bei Säugetieren aus ca. 1000 Genen (Buck and Axel, 1991; Ressler et al., 1994a) und stellt damit eine der größten Multigenfamilien bei Säugern dar. Die Rezeptoren des VNO bilden die drei verbleibenden OR Gen Familien: V1R, V2R und V3R (s. Abb. 1). Die V1R Familie beinhaltet ca. 80 Gene, während die V2R Familie ca. 50-100 und die

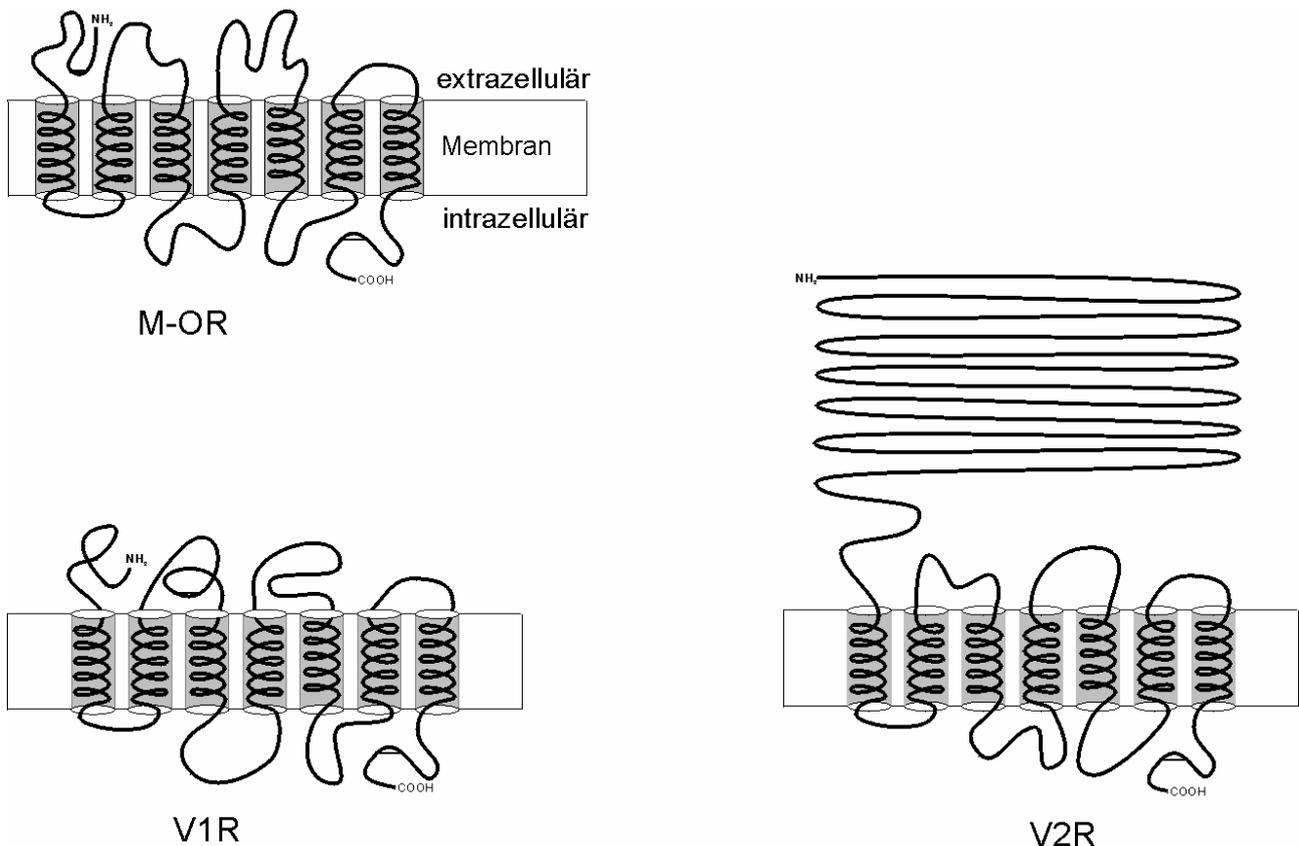


Abb. 1: Dargestellt sind drei der vier bekannten OR Familien. Das MOE beinhaltet einen Rezeptortyp (M-OR), während die Rezeptoren des VNO aus drei verschiedenen Familien bestehen (V1-, V2- und V3R). V3R ähnelt V1R.

V3R Familie ca. 120 Gene beinhaltet (Dulac and Axel, 1995; Herrada and Dulac, 1997; Matsunami and Buck, 1997; Pantages and Dulac, 2000)

OR Gene sind meist in Clustern organisiert und nahezu über das ganze Genom verteilt (Rouquier et al., 1998b). Sie sind besonders häufig an den Telomeren der Chromosomen zu finden (Trask et al., 1998a) und zeigen z.T. extrem hohe Sequenzhomologien zueinander. Es gilt deshalb als gesichert, daß die Vielzahl der OR Gene im Laufe der Evolution nicht nur durch die Duplikation einzelner Gene, sondern auch durch die Duplikation ganzer genomischer Regionen entstanden ist (Glusman et al., 1996; Trask et al., 1998b; Brand-Arpon et al., 1999; Mombaerts, 1999a). Im Verlauf der Evolution sind jedoch nicht alle OR Gene funktionsfähig geblieben. Nach aktuellen Schätzungen sind etwa 50% der Loci nur noch Pseudogene (Fuchs et al., 2001), die Rastermutationen oder *in frame* Stop-Codons aufweisen (Rouquier et al., 1998b). Alle bisher bekannten OR Sequenzen besitzen eine ca. 1 kb lange kodierende Region, die nicht durch Introns unterbrochen ist (Ben-Arie et al., 1994; Glusman et al., 1996; Asai et al., 1996). Bei OR Genen der Maus und des Menschen wurden jedoch nicht kodierende Exons in der 5' untranslatierten Region (UTR) nachgewiesen. Der Anfang dieser Exons ist maximal 11,1 kb stromaufwärts vom Start-Codon lokalisiert (Glusman et al., 1996; Asai et al., 1996; Walensky et al., 1998; Qasba and Reed, 1998; Sosinsky et al., 2000). Exons in der 3' UTR von OR Genen wurden von anderen Wissenschaftlern bisher nicht beschrieben (Sosinsky et al., 2000).

	1	EC1	TM1	CP1	TM2	EC2	TM3	CP2130						
hs6M1-1	1	MNWNES	SPKEFILLGF	SDRAWLQMP	FVLLISYTI	TIFGNVSIMM	VCILDPKLT	PMYFFLNLS	ILDLCYTTTT	VPHMLVNIG	NKKTISYAGC	VAHLIIFLAL	GATECLLLAV	MSFDRYVAVC
hs6M1-10		. . . V . K .	V . Q V .	. . QP . . EI . P	. . MF . F . IL LT . IL	. . SHV . F S . .	L S .	. . Q CN	TR . V . . G .	. . Q . F S C . . F . I .
hs6M1-32		. . . V . D .	IIQ P . . EF .	L . F V LT . IL	. . SR . T S . .	L C .	. . Q LCS	IR . V . . R .	. . Q . F Y F . I .
hs6M1-3		MNDDGKV . A .	. EGY . . . V .	. . NWP . H . EVVI	. . . V . . F . LM	. . LI . LF . II	LSY . . SH S . .	F SS	I . QL . . . LWG	PE	MIQ . YFV T . . V . V Y . . .
hs6M1-6		M . IKK . A .	. EDF NWP . Q . EVV	. . . I . . F . LM	. . LT . LF . II	LSYV . SH S . .	F H . SS	I . QL . . . LRG	PE	MVQ . YFV IA . V . V Y . . .
hs6M1-12		mv . Q .	. TPG . L EHP . G . ERT	. . . VFT . LL	. . LV . TL . IL	LSA S S . .	F F . SC	. . Q LWG	P FLD	SVQIF . . . S .	. . T . . I . T .	. . A
hs6M1-16		mv . Q .	. . MG . L EHP . A . ERT	. . . VFT . LL	. . LV . TL . IL	LSV . Y . R . S SD .	F F . SC	. . Q LWG	P FL	SVQ . F . . . S .	. . T . . I . T .	. . A
hs6M1-15		. DQS . Y .	. LHG NHP . KME . I	SG . VA . F . L	. . LV . TA . IL	ASL . . SQ R . .	F F . SI	I . Q LWG	PD V .	IIQ . YVYMW .	. . SV Y . FT . I .
hs6M1-17		MSA . T .	MVT . . L HL . D . GL	. . S . F . TI . LL	. . VA . FL . VV	LVST . AA . QS RT .	A . EIG . . SV	. . LL . HLLT	GRRH . . RS .	ALQMFF . . FF C . . A	. . AY . . A . I .
hs6M1-21		. ERK . QT	AIT . . . I NLNE . FL	. . TIFFLT . FC	. . LG . IL . IL	TTVT . . H Y . G . A	FI . I . . . SN	. . Q . M . HLLS	K . . S . . V .	. VQ . FA . VVF	VGS . R . . TA	. AY . . I . I .
hs6M1-35		. EGK . QT	NIS . . L SWQQO . VL	. . ALF . CL . LT	GL . . LL . LL	AIGS . HC A . .	LV . . . LPSA .	. . K . . L . QT	QTQ . . . P .	L . QMYPCCMMF	ANMDFN . . T	. AY . . . I .
hs6M1-20		ML . TT	. VT . . L . . V	T . IQE . . PF	. . . F . TI . F	SVT . . GAVL	IV . S . . R . S	L G .	Y . . I . S . V	L . K . . Q . FLS	TH . A . FL	ISQ . HF . HF	. . S . SM . F .	. . A . LS . I .
hs6M1-27		M . LV	TMN . L . . L	TGVQE . . PPF	. . GIP . I . L	NLI . G . LV	MVV . E . Q . S G .	C . IS . SSV	L . KL . . LV	SRRA . FL	ITQ . HF . HF	. . S . AI . . I	. . A . F . I .
hs6M1-28		MV . LT	. MSG . L . M .	. . ERK . ILH	AL . F . VT . LL	ALT . . LL . IT	IITV . RR . S Y . KH .	L FISV .	. . QSIA . SLM	GNGY . LVQ	ILQVFF . I .	ASS . VAI . T	. . Y . . A . I .
hs6M1-18		MEIVSTG . T	-IT . V	Y . IPE . HFLF	. I . FTAV . VF	I . I . ML . IV	AVVSSQR . . K I . A . .	F . IL . . SAV	M . K . . EGFL	QEA . . V . .	LLQFF . . GS	ATA AY . . L . I .
hs6M1-1	131	CP2	TM4	EC3	TM5	CP3	TM6	260						
hs6M1-1		RPLHYVVIMN	YWFCRLMAAF	SWLIGFGNSV	LQSSLTLMNP	RCGHQEVDFH	FCEVPALLKL	SCADTKPIEA	ELFFFSVLIL	LIPVTLILIS	YGFIAQAVL-	KIRSAEGRQK	AFGTCGSHMI	VVSLFYGTAI
hs6M1-10	 SI . H	QRL . FQL . A	. . IS . S TW . K .	L . . K V . TAN I . . F I . . F	. . A . V R . Q QR L L S . V
hs6M1-32	 S . H	QRL . QL . A	. . VT . S . . .	WL . T . . QL	L . DPYVI . .	L VE . TAN LV . E . FH	. . L A . VR R . Q L S . V
hs6M1-3	 T . LH	PR . HLL . VA	. . VS . T . A	. . H . F . FWV	L . . RQ R .	. . V . HVN . L	T . MIT . SIFV	. . LI . . . T	. . A . VR	RMQ . TT . L .	V A . LM FIP . M
hs6M1-6	 T . LH	PR . HLL . A	. . V . . TI . A	. . H . F . FWV	L . . RL R .	. . V . HAN . L	T . MVM . SIFV	. . LI . . TA	. . A . R	SMQ . TT . L .	V . R . . A . LM FIP . VM
hs6M1-12		Q AT . IH	PRL . WQL . SV	A . V . LVE . .	V . TPS . HL	F . PDRQ . D	V IR .	. . E . SYN . I	QVAVA . F .	VV . LS . . V .	. . A . TW	R . N . K . R S . LT	. . T . . SSV .
hs6M1-16		Q AT . IH	PRL . WQL . SV	A . VMSLVQ . I	V . TPS . HL	F . P . QI . D	L S . IR .	. . G . SYN . I	Q . AVS . IFV	VV . LS . . A .	. . AT	R . N . TAWR S . LT	. . T . . SSV .
hs6M1-15		K F . V .	PHL . K . IIM	I . S . SLA . . .	VLC T . . . L	T . NNIL . .	L . L . . V . I	A . V . TTV . M	SV . ALGII . V	T . LI Y . K	RTK . KASQR .	MN LT	. . M I .
hs6M1-17		E . R . PLLLS	HRV . QL . GS	A . AC . VLVGL	GHTPFIFSL	F . PNPIQ .	. . IQPV . Q	V . G . SLN . L	QIILATA . LI	. C . FG . . G .	. R . LVTIF -	R . P . VA . R .	. . S . S . L L .
hs6M1-21		N . R . S . LS	KVL . NQL . S	C . AA . L . . .	VHTV . FCL	F . NNQINY .	. . DI . P . I .	. GN . SVN . L	A . LSTG . F . G	WT . FLC . VL	. IC . ISTI -	R . Q . S . . R .	. . S . A . LA	I . F S .
hs6M1-35		H ST . A	LRL . ASLV . A	P . V . AIL . PL	. HTLMMHLH	F . SDNVIH .	. . DINS . P .	. S . SLNQL	SVLATVG . F	VV . SVC . V .	. IL . VS . M -	. VP . Q . KL .	. . S LA	L . I AIT
hs6M1-20		K . R . T . . .	PQL . TQ . IT	I . V . . FHAL	. H . VM . SRLN	F . SNRIH .	L . DIKP . . .	A . GN . ELNQW	L . STVTGT . A	MG . FF . T . L	. FY . ITYLF	. T . CSMLC .	. LS . A . FM	. I APVL
hs6M1-27		N . R . T . . .	PQV . ILL . A	A . . S . FYAL	MH . VM . AHL	F . S . KLN .	. . YD . KP . E . A	S . . LLNQW	L . SIVTGS . S	MGAFF . T . L	CFYVIGFL . F	. N . CRILH .	. LS . A . FM	. C PVG
hs6M1-28		Q ET . D	PRA . RHAVIA	V . IA . GLSGL	MHAAINFSI	L . KRVIHQ .	. . D . QM . .	A . SYEFIN . I	A . AA . TTSAA	F . CLIS . VL	. IR . FST . -	R . P T	V . S . LP . LF	. ATF . LSA . G
hs6M1-18		Y PLL . G	PRRYMGLVVT	T . S . VVDG	. VVA . VAQLR	F . PNHI . Q .	Y . DFMLFVG .	A . S . PRVAQV	TTLL . FC .	T . FG . . T .	. AR . VV . . -	RVPAGAS . RR	. S . S . LA	. TT LM
hs6M1-1	261	TM6	EC4	TM7	CP4	327								
hs6M1-1		YMYLQPPSST	SKDWGKMVSL	FYGIITSMNL	SLIYSLRNKD	MKEAFKRLMP	RIFFCKK							
hs6M1-10		S PS	. . R C . . AP . . .	P . . T . . . E	V VA	KSLL							
hs6M1-32		SV PS AP AP . . .	P . . T . . . E	V . G . . . VA	. V . LI . .							
hs6M1-3		CI GN	. Q . Q . FIA .	. . TVV . PS .	P . . T . . V	VRG . V . . G	WE							
hs6M1-6		C EN	. P . Q . FIA .	. . TVV . PS .	P . . T . . H	V . G . A . . LG	WEWGR							
hs6M1-12		AV KNPY	AQER . . FFG .	. . AVG . PS .	P . . T . . E	VTR . R . LG	KEMGLTQS							
hs6M1-16		AV KNPY	AQGR . . FFG .	. . AVG . PS .	P . V . T . . E	I . R . LR . LG	KERDSRESWR	AA						
hs6M1-15	 GNRA	. . Q . FLT .	. . TV . PS .	P . . T D . L . K . R	FHHKST . IKR	NCKS						
hs6M1-17		FI . IR . KA . Y	DPATDPL AVV . PI .	PI TE	V . A . L . TIQ	KTVPMEI							
hs6M1-21		FT . VR . I . TY	. LKKDRL . V	L . SVV . P . .	PI . T	I . . V . TIGS	KWQPPISSLD	SKLTY						
hs6M1-35		GV . MS . L . NH	. TEKDSAA . V	IFMVVAPV . .	PF NE	L . GTL . KTL								
hs6M1-20		FT . IH . ALES	FM . QDRI . AI	M . TVV . PV . .	P . . T . . . E	V . G . LG . VIR	. I							
hs6M1-27		FT . IR . A . A .	. MIQDRIMAI	M . SAV . PV . .	P . . T . . . E	VMM . L . KIFG	. KL . KDWQOH	H						
hs6M1-28		FEF . RL . DS	. STVDLVF . V	. . TV . PPT . .	PV DS	. A . LRKMLS	KEELPQRKMC	LKAMFKL						
hs6M1-18		IF . VA . SAVH	. QLLS . VF . .	L . TVV . PLF .	PV . TM . . . E	VHQ . LRKILC	IKQETLMD							

Abb. 2: Multiples Alignment von 15 HLA-gekoppelten olfaktorischen Rezeptoren mit ORF. EC: extrazelluläre Domäne; TM: Transmembran Domäne; CP: cytoplasmatische Domäne.

1.4. Signaltransduktion in olfaktorischen Neuronen

In den olfaktorischen Neuronen des MOE von Vertebraten erfolgt die Transduktion der Duftstoffe in elektrische Signale hauptsächlich über die cAMP-Kaskade. Die verschiedenen Komponenten dieser Kaskade sind bereits in olfaktorischen Neuronen nachgewiesen worden: die α - Untereinheit des G_{olf} Proteins (Jones and Reed, 1989), die Adenylatcyclase III (Bakalyar and Reed, 1990) und zwei Membrankanäle, die durch zyklische Nukleotide aktiviert werden (Bradley et al., 1994; Liman and Buck, 1994) (s. Abb. 3). Die flüchtigen Duftstoffe werden vermutlich zunächst an ein lösliches Transport-Protein (OBP: odorant binding protein) gebunden und so durch die wässrige Mukosa zu den Rezeptoren transportiert (Briand et al., 2000). Die Bindung des Duftstoffes an den Rezeptor führt zur Aktivierung des G-Proteins G_{olf} und somit über die cAMP-Kaskade zur Öffnung von Ca^{2+} - und Ca^{2+} aktivierten Chlorid-Kanälen (Schild and Restrepo, 1998; Frings et al., 2000). Zusätzlich gibt es Hinweise auf die Beteiligung von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP3) bei der Signaltransduktion (Boekhoff et al., 1990; Restrepo et al., 1990; Ronnett et al., 1993; Okada et al., 1994) (s. Abb. 3). Einzelne Duftstoffe können sowohl einen Anstieg von cAMP als auch von IP3 hervorrufen (Boekhoff et al., 1990; Ronnett et al., 1993). Es wird angenommen, daß die α -Untereinheit des G_{olf} -Proteins die Adenylatcyclase aktiviert, während die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G_{olf} -Proteins die Phospholipase C (PLC) stimulieren (Sternweis, 1994; Buck, 1996) (s. Abb. 3). Bei Hummern und Fischen wurde bereits nachgewiesen, daß cAMP und IP3 in einem einzelnen Neuron coexistieren, aber gegensätzliche Effekte haben: Der cAMP-Weg führt zu einer Hemmung, während der IP3-Weg zur Erregung führt (Ache, 1994).

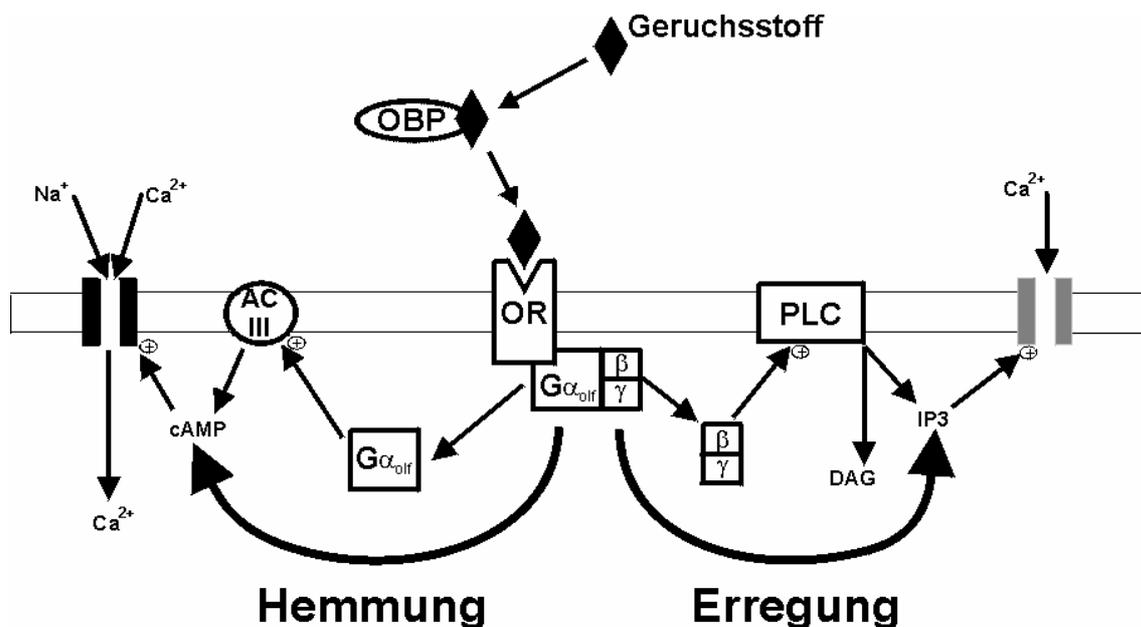


Abb. 3: Modell der olfaktorischen Signaltransduktion (modifiziert nach (Buck, 1996)). Das Transport-Protein OBP transportiert den Duftstoff zu dem Rezeptor. Die Bindung des Geruchsstoffes an den Rezeptor kann sowohl die inhibitorische cAMP-Kaskade über das $G_{\alpha_{olf}}$ -Protein als auch die erregende IP3-Kaskade über die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G_{olf} -Proteins auslösen (Briand et al., 2000). AC III (Adenylatcyclase III); PLC (Phospholipase C); DAG (Diacylglycerol).

Allerdings ist die Diskussion bezüglich des IP₃ Transduktionsprozesses zwiespältig: Andere Studien konnten kein IP₃ bei der Signalübertragung von Gerüchen nachweisen (Kleene et al., 1994; Brunet et al., 1996; Belluscio et al., 1998). Es wird auch diskutiert, daß IP₃ nur indirekt wirkt, indem es cAMP Effekte moduliert (Ache, 1994).

Auch bezüglich cGMP und Kohlenmonoxid wird spekuliert, ob sie eine Rolle bei der olfaktorischen Signaltransduktion spielen (Verma et al., 1993). Dies gilt ebenfalls für eine ganze Reihe von Ionen (Na⁺, Ca²⁺ usw.) (Dionne and Dubin, 1994).

1.5. Expression von Olfaktorischen Rezeptorgenen

Die OR Gene werden nicht nur im olfaktorischen Epithel exprimiert, sondern sind bereits in zahlreichen anderen Geweben gefunden worden (Parmentier et al., 1992; Vanderhaeghen et al., 1993; Vanderhaeghen et al., 1997a; Dreyer, 1998). Daher wird angenommen, daß die Rezeptor Proteine noch eine andere Funktion besitzen als nur die der Geruchswahrnehmung (Dreyer, 1998). Die OR im Hoden könnten z.B. eine Rolle bei der Reifung der Spermien, Spermienkinetik und/oder bei der Chemotaxis zwischen Spermien und Eizellen spielen (Vanderhaeghen et al., 1993; Vanderhaeghen et al., 1997a; Branscomb et al., 2000). Bei Säugetieren werden 10% der OR im Hoden exprimiert (Branscomb et al., 2000).

Die OR Expression in anderen Organen könnte für die Embryo- und Organogenese wichtig sein. Außerdem könnten sie als Zelloberflächenrezeptoren für viele kleine Moleküle innerhalb des Organismus dienen (Dreyer, 1998). Für diese Hypothese spricht, daß die ORs zu einer sehr umfangreichen Multigenfamilie gehören, die erstens zahlreiche hochspezifische Zelloberflächenrezeptoren kodieren können, und zweitens breitgefächert im Organismus zu finden sind (Dreyer, 1998). Des weiteren sind ORs bereits in embryonalen und nicht ausdifferenzierten Geweben nachgewiesen worden (Drutel et al., 1995; Wetzal et al., 1999; Goto et al., 1999).

1.6. HLA (Human Leucocyte Antigen), HLA-gekoppelte Olfaktorische Rezeptorgene und der Fortpflanzungserfolg

Der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (MHC) spielt bei der adaptiven sowie der angeborenen Immunabwehr eine extrem wichtige Rolle. Der menschliche MHC befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 in der Region 6p21.3 und wird als HLA (Human Leucocyte Antigen) bezeichnet. Er erstreckt sich über einen Bereich von 3,6 Mega(M)bp, was etwa 2-3 Centimorgan entspricht, und enthält u.a. MHC-Klasse I (HLA-A, -B, -C, -E, -F und -G) und MHC-Klasse II (HLA-DR, -DQ und -DP) Gene (Campbell and Trowsdale, 1993; The MHC sequencing consortium, 1999). HLA-Klasse I Moleküle binden intrazellulär die Abbauprodukte eigener und fremder Proteine. Im Anschluß daran wandern die resultierenden HLA/Peptid Komplexe an die Zelloberfläche. Hier wird das Peptid im Kontext des HLA-Moleküls von zytotoxischen T-Zellen überprüft, wobei nur körperfremde Peptide zur Aktivierung von T-Zellen mit der entsprechenden Spezifität führen. Im Laufe der Evolution haben sich zahlreiche HLA-Allele entwickelt, die die

Abwehr einer Vielzahl von Krankheitserregern innerhalb der Spezies gewährleisten. Deshalb ist der HLA-Komplex eine der Regionen mit dem höchsten Polymorphismusgrad im menschlichen Genom.

Bei Inzucht-Mäusen und -Ratten ist nachgewiesen worden, daß Produkte vom MHC den individualspezifischen Geruch beeinflussen können (Yamazaki et al., 1979; Singh et al., 1987; Brown et al., 1989; Penn and Potts, 1998a; Penn and Potts, 1998c; Yamazaki et al., 1999), der zumindest bei Mäusen und Ratten eine wichtige Rolle bei der Partnerwahl spielt (Yamazaki et al., 1976; Potts et al., 1991; Penn and Potts, 1998b). Durch Verhaltensexperimente konnte gezeigt werden, daß MHC-unähnliche Paarungspartner bevorzugt werden. So beeinflußt z.B. bei Mäusen bereits eine Punktmutation im H-2K Gen (als H-2 bezeichnet man den MHC bei Mäusen) den Fortpflanzungserfolg (Yamazaki et al., 1986). Auch bei Menschen wurde eine Präferenz für HLA-unähnliche Partner nachgewiesen: Körpergerüche werden als "attraktiver" empfunden, je größer die Differenz in den HLA-Klasse I Antigenen ist (Wedekind et al., 1995; Wedekind and Furi, 1997). Bei Frauen, die die Pille nehmen, ist die Situation eher umgekehrt: Sie favorisieren Körpergerüche von HLA-ähnlichen Individuen (Wedekind et al., 1995; Wedekind and Furi, 1997). Ein Zusammenhang zwischen Produkten von MHC und OR Genen wurde bereits 1976 von Yamazaki und Kollegen vermutet (Yamazaki et al., 1976). Ein derartiger funktioneller Zusammenhang könnte entstanden sein, um Inzucht zu vermeiden oder um die Selektion eines MHC-divergenten Partners zu begünstigen. Die resultierenden MHC-heterozygoten Nachkommen wären somit besser gegen Krankheiten geschützt (Potts and Wakeland, 1993; Beauchamp and Yamazaki, 1997; Penn and Potts, 1998a). Gekoppelte Gene, die Partnerwahlpräferenzen kontrollieren, sind auch bei der Pilzart *Coprinus cinereus* gefunden worden: Miteinander gekoppelte Gene für polymorphe Pheromone und Pheromon-Rezeptoren beeinflussen das Paarungsverhalten dieses Pilzes (O'Shea et al., 1998).

Telomer vom HLA-Komplex (6p21.3-p22.2) wurde ein Cluster olfaktorischer Rezeptoren beschrieben. Er stellt mit 39 OR Genen einen der größten bisher bekannten OR Cluster dar (Younger et al., 2001). 34 Gene dieses Clusters gehören zur M-OR Familie und fünf gehören zur V1R Familie (Younger et al. unpublished). 15 M-OR Gene in diesem Cluster sind potentiell funktionstüchtig, während alle anderen vermutlich Pseudogene darstellen (Younger et al., 2001). Der OR Cluster läßt sich in einen Haupt- und Neben-Cluster unterteilen (s. Abb. 4).

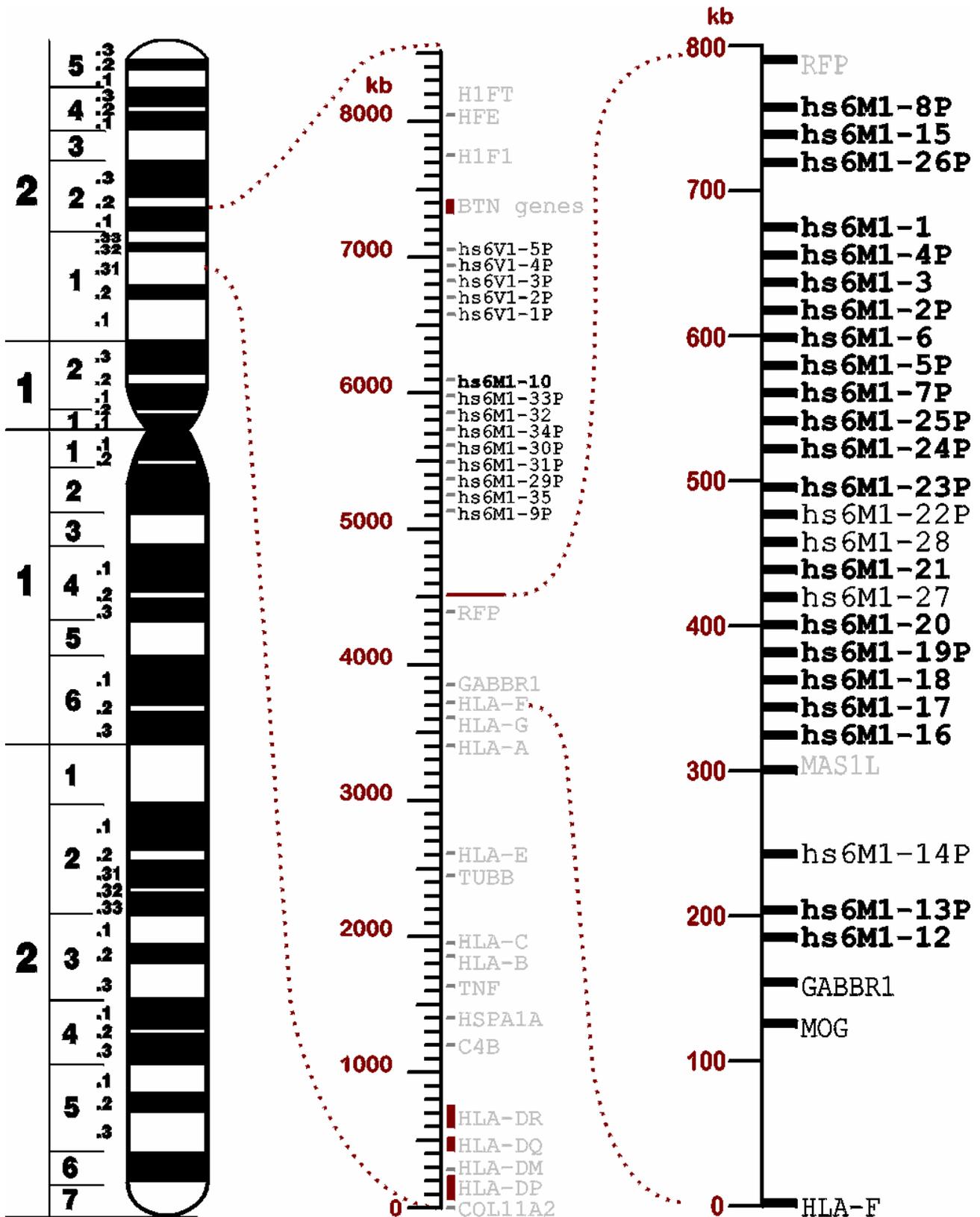


Abb. 4: Chromosom 6 Ideogramm. Angegeben sind alle identifizierten OR Gene in der Nähe des HLA-Komplexes (*hs6M1-1 – hs6M1-35*, und die V1R Typ Gene *hs6V1-1P – hs6V1-5P*) und ihre ungefähre Position in der physikalischen Karte. Die fettgedruckten Gene sind im Detail auf Polymorphismen hin untersucht worden.

Es wurde nachgewiesen, daß die Rekombinationsrate zwischen dem OR Cluster und dem HLA-Komplex extrem niedrig ist, so daß mit großer Wahrscheinlichkeit ein bestimmter HLA-Haplotyp mit einem bestimmten OR-Haplotyp gekoppelt ist (Malfroy et al., 1997; Younger et al., 2001). Die starke Kopplung zwischen diesen beiden Gengruppen unterstützt die Hypothese, daß ein funktioneller Zusammenhang zwischen dem HLA-Komplex und OR Genen bestehen könnte (s.u.) (Ziegler, 1997).

Es stellt sich nun die Frage, ob auch der Mensch den MHC eines anderen über die betreffenden Gen-Produkte riechen kann und ob dies eine Auswirkung auf die Partnerwahl und letztendlich auf den Fortpflanzungserfolg hat. Die Verhaltensexperimente von Wedekind (Wedekind et al., 1995) geben zumindest Hinweise darauf, daß es derartige Phänomene auch beim Menschen gibt. Mit Sicherheit spielen in unserer heutigen zivilisierten Gesellschaft auch visuelle und auditorische Reize sowie soziales Verhalten eine maßgebliche Rolle bei der Partnerwahl. Dennoch scheint der olfaktorische Sinn zumindest im Unterbewußtsein einen maßgeblichen Einfluß darauf zu haben, welche Personen wir als sympathisch oder unsympathisch empfinden.

Die Grundvoraussetzung für eine individuelle Geruchswahrnehmung besteht darin, daß die OR polymorph sind. In diesem Kontext sollte in dieser Arbeit der Polymorphismusgrad sowie der funktionelle Status HLA-gekoppelter OR Gene bestimmt werden, und es sollte untersucht werden, ob eine Beziehung zwischen dem Polymorphismus von HLA-Klasse I/II und OR Genen besteht.

Die Ergebnisse dieses Projektes könnten nicht nur der Grundlagenforschung dienen, sondern auch praktische Bedeutung haben. In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, daß nachgewiesen wurde, daß Oozyten der Maus fähig sind, einen bestimmten paternalen MHC-Haplotypen auszuwählen, und daß diese Selektion abhängig ist von dem MHC-Haplotypen der Eizelle, sowie von Umweltbedingungen wie z.B. eine Virusinfektion des Tieres (Wedekind et al., 1996; Rülcke et al., 1998). Virus-infizierte Mäuse erzeugen mehr MHC-heterozygote Embryos als gesunde Mäuse (Rülcke et al., 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten daher vielleicht erklären, warum viele Paare unfruchtbar bleiben oder warum bisher ungeklärte spontane Aborte auftreten. Des weiteren könnten sie Aufschluß darüber geben, warum die Erfolgsrate bei der *in vitro* Fertilisation nach wie vor sehr niedrig ist, und man könnte andere Therapien anwenden, wie z.B. Intrazytoplasmatische Spermien Injektion (ICSI). Dieses Projekt könnte daher dazu beitragen, daß die Diagnose und die nachfolgende Behandlung bei Infertilität und wiederholten spontanen Aborten verbessert wird.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

1.7.1. Untersuchung der genetischen Kopplung zwischen HLA und olfaktorischen Genen

In einer Kooperation mit dem Sanger Centre (Hinxton) war geplant, Anzahl und funktionellen Status HLA-gekoppelter OR Gene zu bestimmen. Anschließend sollte im Rahmen dieser Arbeit der Polymorphismusgrad der HLA-gekoppelten OR Gene analysiert werden. Ziel war es schließlich, einem bestimmten HLA-Haplotyp einen bestimmten OR-Haplotyp zuzuordnen, was

aufgrund des Kopplungsungleichgewichtes in dieser Region (Malfroy et al., 1997) möglich sein sollte.

1.7.2. Analyse der Expression von HLA-gekoppelten OR Genen in verschiedenen humanen Geweben

Transkripte von OR Genen sind nicht nur im olfaktorischen Epithel gefunden worden, sondern auch in anderen Geweben (Parmentier et al., 1992; Vanderhaeghen et al., 1993; Vanderhaeghen et al., 1997a; Dreyer, 1998). Daher ist anzunehmen, daß die OR auch noch andere Funktionen erfüllen als nur die des Riechens. Um zu analysieren, ob auch die HLA-gekoppelten OR andere Funktionen besitzen könnten, sollte das Expressionsmuster dieser Gene im humanen Organismus untersucht werden. Mit Hilfe der radioaktiven Hybridisierung eines mRNA-Blots sollte die Transkription ausgewählter HLA-gekoppelter OR Gene in verschiedenen Organen analysiert werden. Des weiteren sollte durch *In-situ*-Hybridisierungen an Gewebeschnitten die Expression in den einzelnen Zelltypen eines Organs getestet werden.

1.7.3. Analyse der genomischen Organisation von einzelnen HLA-gekoppelten OR Genen

Um die genomische Organisation zu analysieren, sollte die 3' und 5' untranslatierte Region ausgewählter HLA-gekoppelter OR Gene identifiziert werden. Die Gene sollten auf ihre Exon/Intron Struktur hin untersucht werden, um Hinweise darüber zu bekommen, wie OR Gene reguliert sein könnten.