

Die molekulare Basis der olfaktorischen Chemorezeption**

Uwe J. Meierhenrich,* Jérôme Golebiowski, Xavier Fernandez und Daniel Cabrol-Bass

Stichwörter:

Bioorganische Chemie · Duftstoffe · Genexpression · Proteinmodelle · Proteinstrukturen

Professor Robert Luft gewidmet

Die Fähigkeit lebender Organismen, natürliche oder synthetische chemische Verbindungen in ihrer Umgebung zu identifizieren sowie deren Konzentration abzuschätzen, wird als Chemorezeption bezeichnet.^[1,2] Im April 1970 wurde der Organiker Robert Luft mit der Frage konfrontiert, wie denn flüchtige Duftstoffe vom olfaktorischen System aufgenommen werden. „*Si vous répondez à cette question*“, antwortete er, „*le Prix Nobel est à vous*“.^[3] 34 Jahre später wurde der Nobelpreis für Medizin 2004 an Richard Axel und Linda B. Buck vom Howard Hughes Medical Institute verliehen, denen es gelang, die molekulare Basis der olfaktorischen Aufnahme von Duftstoffen und der anschließenden Informationsverarbeitung im olfaktorischen System zu entschlüsseln. Aus der Sichtweise eines Chemikers bieten diese Arbeiten faszinierende Perspektiven.

Eine Geruchswahrnehmung (Olfaktion) wird durch die molekulare Wechselwirkung chemischer Verbindungen (im Folgenden als Duftstoffe bezeichnet) mit olfaktorischen Neuronen im Epithel des Nasenraumes eingeleitet. Die beteiligten Duftstoffe sind im Allgemeinen durch molekulare Eigenschaften wie moderates Molekulargewicht, geringe Polarität, gewisse Wasserlöslichkeit, hohen Dampfdruck und lipophiles Verhalten gekennzeichnet.^[1] Die Existenz eines peripheren olfaktorischen Rezeptorproteins (OR-Proteins) in der Zilienmembran des Neuroepithels der Regio olfactoria wurde lange Zeit postuliert, ein Beweis für dessen Existenz konnte jedoch erst mit den Arbeiten von Axel und Buck erbracht werden.^[4] Zahlreiche Theorien zur Wechselwirkung zwischen Duftstoffen und olfaktorischen Neuronen waren zuvor entwickelt worden, darunter die Vibrations-Theorie,^[5,6] die Membran-Diffusions-Theorie,^[7] der Piezzo-Effekt,^[8] Komplexierung,^[9] die Polarisations-Theorie,^[10] die Chromatographie-Analogie,^[11] das Wasserstoffbrücken-Modell^[12] und die Tunnel-Vibrations-Theorie.^[13,14]

Seit 1949 hatte man angenommen, dass einzig die charakteristische molekulare Form eines Duftstoffs seinen Geruch bestimmt.^[15,16] Auf der Grundlage der Identifizierung verschiedener Arten von Anosmien (Anosmie = Verlust des Geruchssinns) wurde gefolgert, dass es genauso viele (zwischen 7 und 30) spezifische Rezeptoren mit der Fähigkeit, verschiedene molekulare Formen wahrzunehmen, gibt. So wurde die Existenz eines „Alphabets“ von Duft-

stoffen mit korrespondierenden molekularen Formen postuliert. Die Kombination der Buchstaben dieses Alphabets sollte zur olfaktorischen Wahrnehmung verschiedener Duftstoffe führen.^[17] Seither wurden zahlreiche chemische Studien durchgeführt, um Struktur-Geruchs-Beziehungen abzuleiten.^[18,19] Trotz einiger Erfolge für gewisse Molekülserien und die dazugehörigen Gerüche (z. B. Musk, Amber, Sandelholz) blieben zahlreiche Diskrepanzen und Ausnahmen bestehen.^[1] Ferner blieb es unmöglich, den Geruch eines Moleküls aus dessen Molekülstruktur vorherzusagen. Diese Schwierigkeiten verwundern nicht, schließlich sind Struktur-Geruchs-Beziehungen um Größenordnungen komplexer als ihre pharmazeutischen Analogie, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen.^[13] Unlängst wurde die vereinfachende „sterische Theorie“ von Amore zum Olfaktophor-Konzept weiterentwickelt. Olfaktophore beschreiben, wie Pharmakophore, die räumliche molekulare Anordnung interagierender Gruppen und werden für das rechnergestützte Entwerfen neuer Duftstoffe eingesetzt.^[20] Auch derartige Modelle wurden ohne Kenntnis der Rezeptorseite entwickelt.

1991 publizierten Axel und Buck eine Studie, die wesentlich zum Verständnis der molekularen Basis des olfaktorischen Aufnahmeprozesses beitrug.^[4] Um Zugang zum potenziellen Rezeptorprotein im olfaktorischen Epithel zu bekommen, setzten Axel und Buck die Zugehörigkeit der OR-Proteine zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptorproteine (GPCR-Proteine) voraus. GPCR-Proteine sind in Zell-

[*] Priv.-Doz. Dr. U. J. Meierhenrich, Dr. J. Golebiowski, Dr. X. Fernandez, Prof. Dr. D. Cabrol-Bass
Universität Nizza – Sophia Antipolis
Faculté des Sciences
Laboratoire „Arômes, Synthèses et Interactions“,
Parc Valrose, 06108 Nizza (Frankreich)
Fax: (+33) 4-9207-6125
E-mail: uwe.meierhenrich@unice.fr
Priv.-Doz. Dr. U. J. Meierhenrich
Laboratoire de Chimie Bioorganique
Unité Mixte de Recherche 6001 CNRS-UNSA

[**] Dieses Highlight wurde anlässlich des Nobelpreises für Medizin 2004 verfasst und ist Prof. Dr. Robert Luft gewidmet, der Ende der sechziger Jahre des 20. Jahrhunderts Forschungen zu Duftstoffen an der chemischen Fakultät der Universität Nizza – Sophia Antipolis initiierte.

membranen eingebettet und durchdringen diese siebenmal. Sie bestehen aus sieben Helices, die durch drei extrazelluläre sowie drei intrazelluläre Schleifen zusammengehalten werden. Diese Proteine können chemische Signale im Zelläußeren aufnehmen und in das Innere der Zelle weiterleiten. Dort aktiviert der Rezeptor das innerzelluläre G-Protein, das Effektoren veranlasst, Sekundärsignale innerhalb der Zelle zu produzieren. Das Sekundärsignal schließlich bewirkt, dass die Zelle auf das ursprüngliche externe chemische Signal reagiert. Ein vereinfachtes Schema der transmembranen Protagonisten ist in Abbildung 1 dargestellt.

Vermutlich werden Duftstoffe vor der beschriebenen Wechselwirkung mit transmembranen OR-Proteinen im Mucus von olfaktorischen Transportproteinen (OT-Proteinen) assoziiert.^[21,22] OT-Proteine zählen zur Klasse der Transportproteine und sind in physiologischen Flüssigkeiten zugegen. Es wird angenommen, dass sie aktiv zum Transport der Duftstoffe aus der eingeatmeten Luft durch den Mucus hin zur Ziliennenmembran der olfaktorischen Neuronen beitragen.

Der grundlegende Ansatz von Axel und Buck bestand darin, Sonden zu entwerfen, die in der Lage sind, DNA-Sequenzen zu erkennen, die OR-Proteine im olfaktorischen Epithel kodieren. Dabei wurde eine Klasse von Genen identifiziert, die eine bisher nicht bekannte Familie von GPCR-Proteinen, die so genannten OR-Proteine, kodieren. Die abgeleitete molekulare Struktur eines OR-Proteins ist zusammen mit einem Duftstoff-OT-Protein-Komplex in Abbildung 2 dargestellt.

Genetische Analysen ergaben, dass die OR-Proteine hochvariable Sequenzen aufweisen und allein im olfaktorischen Epithel kodiert wurden. Von nun an konnten zahlreiche Studien durchgeführt werden, um die Zahl und Funktionalität der OR-Proteine zu bestimmen.^[24,25] Mithilfe der Datenbank des menschlichen Genoms (HUGO) konnten Buck et al. 339 intakte OR-Gene sowie 297 OR-Pseudogene identifizieren. Ein Sequenzvergleich führte zur Klassifizierung der menschlichen OR-Proteine in 172 Familien.^[26] Sie konnten zeigen, dass ein einzelnes OR-Protein durch verschiedene Duftstoffe aktiviert werden kann^[27–31] und andererseits ein

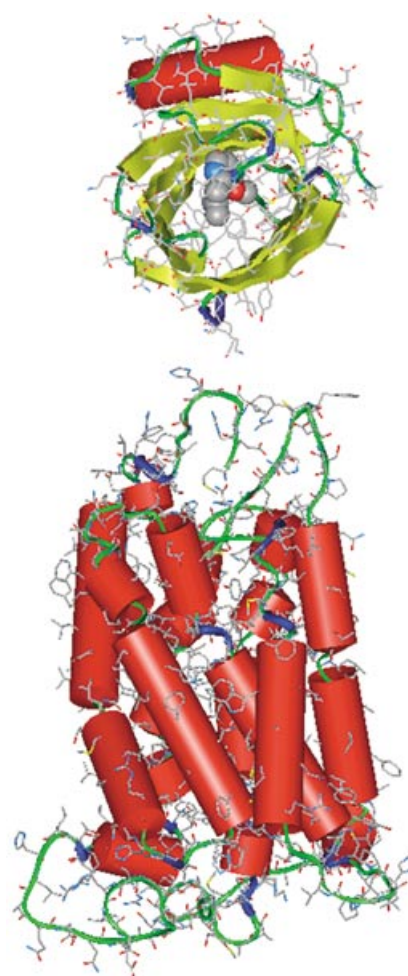


Abbildung 2. Dreidimensionale Struktur eines Komplexes aus dem Duftstoff 2-Isobutyl-3-methoxypyrazin und dem wasserlöslichen, sich im Mucus befindlichen OT-Protein (oben).^[23] Es wird angenommen, dass der Duftstoff zum transmembranen GPCR-OR-Protein (unten) transferiert wird.^[22]

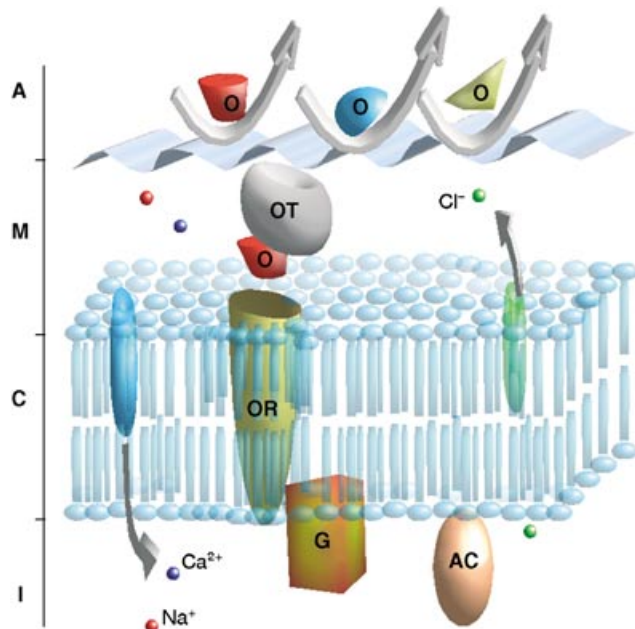


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Bindung des Duftstoffs und der Aktivierung eines Signals. Der Transduktionsmechanismus der Chemorezeption durch die Cilia beginnt mit der Bindung des Duftstoffs **o** aus der Gasphase **A** an das wasserlösliche OT-Protein,^[21] das den Duftstoff durch den olfaktorischen Mucus **M** zum OR-Protein transportiert. Daraufhin wird das intrazelluläre (**I**) G-Protein **G** angesprochen, das die Adenylcyclase **AC** aktiviert. Es folgt ein Öffnen der Ionenkanäle der Zelle **C**, was diese durch Einlass von Ca^{2+} -Ionen sowie Ausstoß von Cl^- -Ionen depolarisiert.

einzelner Duftstoff verschiedene OR-Proteine zu aktivieren vermag.^[29] Als Konsequenz daraus werden Duftstoffe von Rezeptorkombinationen wahrgenommen, die sich teilweise sehr ähnlich sein können. Zahlreiche Duftstoffe aktivieren identifizierbare Kombinationen von OR-Proteinen, auch wenn Überlappungen dieser Kombinationen existieren.^[29] Anhand dieser Resultate wurde die molekulare Basis der Olfaktion identifiziert. Die molekulare olfaktorische Wahrnehmung vollzieht sich durch einen kombinatorischen Prozess. Tatsächlich erlaubt ein derartiger kombinatorischer Prozess aufgrund der großen Zahl an OR-Proteinen die olfaktorische Unterscheidung verschiedenster Duft-

stoffe. Buck et al. schätzten, dass selbst wenn ein Duftstoff nur drei Rezeptoren aktivierte (tatsächlich sind es wesentlich mehr) die Zahl theoretisch unterscheidbarer Duftstoffe etwa bei einer Milliarde läge.^[29] Insofern ist die biologische Methode zur Chemorezeption weit von der simplifizierenden „Schlüssel-Schloss“-Analogie entfernt. Diese Ergebnisse sind mit der olfaktorischen Möglichkeit zur Unterscheidung einer sehr großen Zahl von Duftstoffen konsistent, die verschiedene Strukturen, Molekülgrößen sowie verschiedene Gerüche haben.

Die Sequenz der OR-Proteine wurde indirekt über Untersuchungen der DNA-Sequenz bestimmt. Dreidimensionale Proteinstrukturen können durch direkte Messungen wie Röntgenkristallographie, Elektronenmikroskopie und NMR-Spektroskopie bestimmt werden, wenn die Proteine wasserlöslich sind. Die Strukturbestimmung von nicht wasserlöslichen Proteinen wie den GPCR-Proteinen erfordert dagegen fein austarierte physikalisch-chemische Bedingungen, um Proteinstruktur und -funktionalität zu bestimmen, was derzeit nur mit hohem experimentellem Aufwand gelingt. Daher müssen neue Methoden wie die zweidimensionale Kryomikroskopie angewandt werden, um derartige Strukturbestimmungen durchzuführen.^[32] Somit sind experimentell gewonnene Informationen zur dreidimensionalen Struktur von GPCR-Proteinen begrenzt. Lediglich die Rhodopsin-GPCR-Struktur konnte mittels direkter Messungen bestimmt werden.^[33] Die Struktur des OR-Proteins wurde bislang auf Grundlage von Rhodopsin-Modellen hergeleitet.^[34] In jüngster Zeit begannen Arbeiten zur Ermittlung der unterschiedlichen Antworten eines Rezeptors auf verschiedene Agonisten.^[35] Man ist dabei, die molekulare Basis der olfaktorischen Rezeption zu verstehen, dennoch gibt es wegen des kombinatorischen Prozesses der Olfaktion noch viele unbeantwortete Fragen.

Die interdisziplinären Pionierarbeiten von Axel und Buck haben zahlreiche Implikationen für die Geschmacks- und Duftforschung. Die Kenntnis der molekularen Wechselwirkungen der OR-Proteine mit Duftstoffen kann zur Evaluierung der Wechselwirkung eines Duftstoffs mit definierten Kombina-

tionen von OR-Proteinen beitragen, eine Strategie, die bereits patentiert worden ist.^[36] Der kombinatorische Aspekt der olfaktorischen Informationsverarbeitung und die Wahrnehmung von Gerüchen durch das Erkennen von Mustern lassen Erfolge und Fehler früherer Erklärungsversuche mittels Struktur-Geruchs-Beziehungen oder Olfaktophor-Modellen erkennen. Nach der Bestätigung der dreidimensionalen OR-Proteinstruktur werden Chemiker weitaus besser in der Lage sein, Duftstoffe zu entwerfen, die definierte OR-Proteine aktivieren können. Für praktische Anwendungen bleibt zu bedenken, dass Duftstoffe selten in reiner Form, sondern in teilweise komplexen Mischungen eingesetzt werden. Insofern wird die erfolgreiche Anwendung von Duftstoffen wesentlich von deren Formulierung abhängig bleiben. Die Suche nach neuen Duftstoffen, Deodorants und deren Modifikatoren ist eröffnet.

- [1] G. Ohloff, *Scent and Fragrances*, Springer, Heidelberg, **1994**, S. 9, zit. Lit.
- [2] S. Firestein, *Nature* **2001**, *413*, 211–218.
- [3] „Wenn Sie diese Fragen beantworten können, verdienen Sie den Nobelpreis.“ Nice-Matin, 2. April **1970**.
- [4] L. Buck, R. Axel, *Cell* **1991**, *65*, 175–181.
- [5] G. M. Dyson, *Chem. Ind.* **1938**, *57*, 647–651.
- [6] a) R. H. Wright, *Nature* **1972**, *239*, 226; b) R. H. Wright, *J. Theor. Biol.* **1977**, *64*, 473–502; c) R. H. Wright, *The sense of Smell*, CRC, Boca Raton, **1982**.
- [7] a) J. T. Davies, F. H. Taylor, *Nature* **1954**, *174*, 693–694; b) J. T. Davies, F. H. Taylor, *Proc. Int. Congr. Surf. Act.* **1957**, *4*, 329–340; c) J. T. Davies, F. H. Taylor, *Biol. Bull. (Woods Hole, MA, U.S.)* **1959**, *117*, 222–238.
- [8] M. H. Briggs, R. B. Ducan, *Nature* **1961**, *191*, 1310–1311.
- [9] B. Rosenberg, T. N. Misra, R. Switzer, *Nature* **1968**, *217*, 423–427.
- [10] a) H. G. B. De Jong, G. G. P. Saubert, *Proc. Acad. Sci. (Amsterdam)* **1937**, *40*, 302; b) H. G. B. De Jong, G. G. P. Saubert, *Protoplasma* **1937**, *28*, 329.
- [11] M. M. Mozell, *J. Gen. Physiol.* **1970**, *56*, 46–63.
- [12] M. Chastrette, D. Zakarya in *The Human Sense of Smell* (Hrsg.: D. G. Laing, R. L. Doty, W. Breipohl), Springer, Berlin, **1991**, S. 77–92.
- [13] L. Turin, F. Yoshii in *Handbook of Olfaction and Gustation*, 2. Aufl., (Hrsg.: R. L. Doty), Marcel Dekker, New York, **2002**, S. 275–294.

- [14] L. Turin, *J. Theor. Biol.* **2002**, *216*, 367–385.
- [15] a) R. W. Moncrieff, *Am. Perfum. Essent. Oil Rev.* **1949**, *54*, 453–454; b) R. W. Moncrieff in *The Chemical Senses*, 2. Aufl., CRC, Cleveland, **1951**.
- [16] a) J. E. Amoore, *Molecular Basis of Odor*, Thomas CC, Springfield, **1970**; b) J. E. Amoore, *Perfum. Essent. Oil Rec.* **1952**, *43*, 321–330; c) J. E. Amoore, *Nature* **1963**, *198*, 271–272; d) J. E. Amoore, *Chemical Senses*, Springer, Berlin, **1971**.
- [17] J. E. Amoore, *Chem. Senses Flavour* **1977**, *2*, 267.
- [18] K. J. Rossiter, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3201–3240, zit. Lit.
- [19] M. Chastrette, *SAR QSAR Environ. Res.* **1997**, *6*, 215–254, zit. Lit.
- [20] P. Kraft, J. A. Bajgrowicz, C. Denis, G. Fräter, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 3106–3138; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2980–3010.
- [21] Bisher wurde das olfaktorische Transportprotein als olfaktorisches Bindungsprotein (OB-Protein) bezeichnet. Wir schlagen hiermit die Bezeichnung OT-Protein vor, weil 1. der Begriff „Bindung“ zu unspezifisch zur Beschreibung der hydrophoben chemischen Wechselwirkung zwischen Duftstoff und Protein ist und 2. der Begriff „Transport“ die Prozesse der Inklusion, des Transportes sowie der Abgabe des Duftstoffes an das OR-Protein zu beschreiben vermag.
- [22] P. Pelosi, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1994**, *29*, 199–228.
- [23] Die Struktur des OT-Proteins wurde unverändert aus Datenbanken der Röntgenkristallographie entnommen (PDB id. 1DZK). Die dreidimensionale Struktur des OR-Proteins wurde nach Lit. [33] in Analogie zur experimentell bestimmten Rhodopsinstruktur erstellt.
- [24] J. M. Young, C. Friedman, E. M. Williams, J. A. Ross, L. Tonnes-Priddy, B. J. Trask, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 535–546.
- [25] X. Zhang, S. Firestein, *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 124–133.
- [26] B. Malnic, P. A. Godfrey, L. B. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2584–2589.
- [27] H. Zhao, L. Ivic, J. Otaki, M. Hasimoto, K. Mikoshiba, S. Firestein, *Science* **1998**, *279*, 237–242.
- [28] D. Krautwurst, K. W. Yau, R. R. Reed, *Cell* **1998**, *95*, 917–926.
- [29] A. B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, L. B. Buck, *Cell* **1999**, *96*, 713–723.
- [30] K. Touhara, S. Sengoku, K. Inaki, A. Tsuboi, J. Hirono, T. Sato, H. Sakano, T. Haga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 4040–4045.
- [31] C. H. Wetzel, M. Oles, C. Wellerdieck, M. Kuczkowiak, G. Gisselmann, H. Hatt, *J. Neurosci.* **1999**, *19*, 7426–7433.

- [32] G. Müller, *Curr. Med. Chem.* **2000**, 7, 861–888.
- [33] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, 289, 739–745.
- [34] W. B. Floriano, N. Vaidehi, W. A. Goddard III, M. S. Singer, G. M. Shepherd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 10712–10716.
- [35] W. B. Floriano, N. Vaidehi, W. A. Goddard III, *Chem. Senses* **2004**, 29, 269–290.
- [36] L. Buck, R. Axel, US 9217585; US 2002–064817.

Quality counts...

The best of chemistry every week



Wiley-VCH

P.O. Box 10 11 61
69451 Weinheim
Germany
Phone +49 (0) 6201–606-400
Fax +49 (0) 6201–606-184
e-mail: angewandte@wiley-vch.de

www.angewandte.org

Angewandte Chemie International Edition is a journal of the GDCh, the German Chemical Society

GDCh

 **WILEY-VCH**