

Die Aufklärung des Geruchssinns (Nobel-Vortrag)**

Linda B. Buck*

Stichwörter:

Fluoreszenz · Hirnforschung · Nobel-Vortrag · Rezeptoren · Riechzellen

Aus dem Inhalt

Biographisches	6283
1. Einleitung	6288
2. Geruchsrezeptoren	6288
3. Die Verteilung der Geruchsrezeptoren im Riechepithel	6290
4. Kombinatorische Rezeptorcodes für Gerüche	6291
5. Eine Musterkarte eingehender Geruchsrezeptorsignale im Riechhirn	6292
6. Die Codierung von Gerüchen im Riechepithel und im Riechhirn	6293

Biographisches

SEATTLE

Ich wurde 1947 in Seattle, einer von Bergen, Wäldern und dem Meer umgebenen Stadt, als die zweite von drei Töchtern geboren. Die Eltern meiner Mutter waren gegen Ende des 19. Jahrhunderts aus Schweden in die USA eingewandert. Mein Vater stammte einerseits von Iren ab, andererseits von Amerikanern, die schon zur Zeit des Unabhängigkeitskriegs im Land waren. Meine Mutter war eine ausnehmend freundliche und humorvolle Hausfrau, die Kreuzworträtsel liebte. Mein Vater war Elektroingenieur und verbrachte einen großen Teil seiner Freizeit damit, Dinge zu erfinden und in unserem Keller zu basteln. Es mag diese Kombination gewesen sein, die den Grundstock für mein zukünftiges Interesse an der Wissenschaft legte. Allerdings träumte ich als Kind nie davon, einmal eine Wissenschaftlerin zu werden.

Während meiner Kindheit spielte ich, wie viele andere Mädchen, gerne mit Puppen; andererseits war ich neugierig, wenn auch schnell gelangweilt, und begab mich häufig auf die Suche nach neuen Abenteuern. Abgesehen von der Schule und dem Musikunterricht genoss ich dabei weitgehende Freiheiten. Ich lernte durch meine Mutter Musik und Schönheit schätzen und mein Vater unterwies mich im Gebrauch von Elektrowerkzeugen und in handwerklichen Fähigkeiten. Ich war viel mit meiner Großmutter mütterlicherseits zusammen, die mir Geschichten von ihrer Kindheit in Schweden erzählte und mir beibrachte, wie ich neue Kleider für meine

Puppen nähen konnte. Ich bin glücklich darüber, dass ich so wunderbar hilfreiche Eltern hatte, die mir sagten, ich könne aus meinem Leben machen, was ich wolle. Sie brachten mir auch bei, unabhängig zu denken und meine eigenen Ideen skeptisch zu prüfen – und sie drängten mich, in meinem Leben etwas Wichtiges zu tun und mich, mit den Worten meiner Mutter, nicht mit „dem Mittelmaß zufrieden zu geben“. Wie ich nun erkenne, habe ich diese Lehren in meiner Karriere als Wissenschaftlerin beherzigt.

Ich begann mein Studium an der University of Washington, die nur ein paar Meilen von meinem Elternhaus entfernt war. Ich wollte stets einen Beruf einschlagen, in dem ich anderen helfen konnte. Daher hatte ich zunächst Psychologie studiert, um Psychotherapeut zu werden. Mit der Zeit entdeckte ich neue Interessen, und ich erwog eine Reihe unterschiedlicher Berufe. Allerdings erschien mir keiner ideal und ich zögerte, etwas anzufangen, das sich als falsch herausstellen könnte. Die nächsten Jahre verbrachte ich abwechselnd reisend, auf einer nahe gelegenen Insel oder studierend

[*] Dr. L. B. Buck
Howard Hughes Medical Institute
Fred Hutchinson Cancer Research Center
1100 Fairview Avenue North, Seattle, WA 98109-1024 (USA)
Fax: (+1) 206-667-1031
E-mail: lbuck@fhcrc.org

[**] Copyright© Die Nobel-Stiftung 2004. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Erlaubnis zum Abdruck einer deutschen Fassung des Vortragstextes.

in Seattle. Schließlich fand ich meinen Weg, als ich einen Kurs in Immunologie belegte: Dieses Fach faszinierte mich, und daher würde ich Biologin werden.

DALLAS

1975 fing ich als Graduate Student am Institut für Mikrobiologie des Southwestern Medical Center der University of Texas in Dallas an. Das Institut war kurz zuvor um das noch junge Arbeitsgebiet die Immunologie erweitert worden, und es war ein anregender Studienort. Ich hatte an der University of Washington schon geforscht, zuerst über Psychologie bei Walter Makous und dann bei Ursula Storb in Immunologie, aber erst in Texas wurde ich wirklich zur Wissenschaftlerin. Für meine Doktorarbeit hatte ich in Ellen Vitetta eine wundervolle Betreuerin; sie erwartete in der Forschung höchste Qualität und Präzision – Eigenschaften, die Studenten meines Erachtens erwerben müssen. In meiner Doktorarbeit verglich ich die Funktionen von Untertypen von B-Lymphozyten, deren Zelloberflächen über Immunglobuline unterschiedlicher Klassen als Antigenrezeptoren verfügten. Wie auch bei einem Großteil meiner späteren Forschungen, trachtete ich bereits danach, die molekularen Mechanismen in biologischen Systemen mit meinen Experimenten aufzuklären.

NEW YORK

1980 wechselte ich dann als Postdoktorandin in die Gruppe des Immunologen Benvenuto Pernis an der Columbia University in New York City. Als Studentin hatten mich die unbekannten Abläufe bei der Immunantwort der Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) fasziniert, die später aufgeklärt werden sollten. Ich entschied mich, diese Fragestellung zu untersuchen und konzentrierte mich dabei auf MHC-Proteine der Klasse II auf der Oberfläche von B-Lymphozyten. Anders als erwartet sammelten sich die MHC-Proteine schnell im Innern dieser Zellen an, nachdem sie aktiviert wurden. Meine weiteren Ergebnisse deuteten darauf hin, dass sie von der Zelloberfläche ins Innere geholt und später wahrscheinlich zurücktransportiert werden. Es war bekannt, dass Antigene zusammen mit Antigenrezeptoren durch Endocytose in die Zelle transportiert und anschließend abgebaut werden. Die Internalisierung und die vermutete Regenerierung von MHC-Molekülen könnten dadurch erklärt werden, dass die Moleküle in der Zelle in eine spezielle Mikroumgebung überführt werden, in der sie mit dem abgebauten Antigen wechselwirken können. Die MHC-Antigen-Komplexe könnten anschließend an die Zelloberfläche gebracht werden und dort an der Erkennung von T-Helferzellen beteiligt sein.

Inzwischen war mir klar geworden, dass die Untersuchung molekularer Mechanismen in biologischen Systemen die Kenntnis der neuen molekularbiologischen Verfahren voraussetzte. Ich wechselte daher in die Gruppe von Richard Axel, der ebenfalls an der Columbia University forschte.

Richard hatte einige Jahre zuvor im Zuge einer Kooperation mit Eric Kandel von derselben Universität begonnen, auf dem Gebiet der Neurowissenschaften zu arbeiten. Ihre Zusammenarbeit konzentrierte sich auf molekularbiologische Untersuchungen des Nervensystems von *Aplysia*, einer Meeresschnecke. Eric hatte diese Schnecke in zahlreichen Studien über Lernen und Gedächtnis als Modellorganismus eingesetzt, für die er im Jahr 2000 einen Nobelpreis erhielt. Es ist vielleicht nicht überraschend, dass ich mich für Gene interessierte, die Rezeptoren neuronaler Zelloberflächen codieren. Da Richard aber die Erforschung von *Aplysia* fortsetzen wollte, übernahm ich ein Teilprojekt: Ich suchte nach einem Verfahren zum Klonen von Genen, die in einem *Aplysia*-Neuron exprimiert werden, in anderen aber nicht. Nach einer kurzen Unterweisung in molekularbiologischen Techniken durch Jim Roberts, einen meiner Studenten, fing ich mit meinem Projekt an. Eric Kandels Gruppe zeigte mir, wie man die *Aplysia*-Riesenneuronen isoliert, denen man Namen gegeben hatte und die anhand ihrer Position identifiziert werden konnten. Schon nach relativ kurzer Zeit fand ich Gene, die in den *Aplysia*-Neuronen unterschiedlich exprimiert werden.

Bei der Untersuchung eines Gens für ein Neuropeptid, das in Neuron R15 exprimiert wird, entdeckte ich, dass das Gen auch in einigen anderen Neuronen exprimiert wird. Das primäre Transkript wird aber jeweils anders gespleißt und führt daher zu unterschiedlichen Polyproteinen. Die beiden Polyproteine könnten in verschiedenen Neuronen unterschiedliche Peptidkombinationen liefern, woraus sich physiologische oder Verhaltensprogramme mit partiell überlappenden Komponenten ergeben könnten. Zahlreiche technische Schwierigkeiten zwangen mich, mein Wissen zu erweitern und meine Fähigkeiten zu verbessern. Während dieser Zeit lernte ich auch eine Menge über Molekularbiologie von Richard und seiner Gruppe. Ich machte auch die Bekanntschaft von Eric Kandel, der mich im Laufe der Jahre stets inspirierte und ermutigte.

Von Beginn meiner neurowissenschaftlichen Studien an war ich fasziniert von der Vielseitigkeit der Zellen und Verknüpfungen im Gehirn. Parallel zu meinen Experimenten mit *Aplysia* suchte ich sporadisch nach Wegen, um Gene im Genom aufzuspüren, die umgelagert oder umgewandelt worden waren. Meiner Auffassung nach könnten Gene mit diesem Charakteristikum an der Entstehung verschiedenartiger Neurone beteiligt sein. Ein Verfahren war bei *Drosophila* aussichtsreich, für das viel größere Genom von Säugetieren (das mich interessierte) aber nicht empfindlich genug. Dennoch hielten mich diese kreativen Bemühungen bei Laune, während ich meine weniger spektakuläre Suche nach winzigen abweichenden Exons im Genom von *Aplysia* fortsetzte.

Ich bin Richard dankbar dafür, dass er meine Extratouren tolerierte. Er war ein ungewöhnlicher Mentor, der seinen Mitarbeitern bei ihren Forschungen weitgehende Freiheit ließ, wenn sie sich erst einmal bewährt hatten. Während dieser Zeit an der Columbia University führte ich mit vielen Kollegen anregende und lange wissenschaftliche Diskussionen. Dazu gehören George Gaitanaris, der mir über die Jahre

ein enger Freund geblieben ist, sowie die Neurowissenschaftler Tom Jessell und Jane Dodd, von denen ich eine Menge über die Entwicklung von Nerven lernte.

Gegen Ende des *Aplysia*-Projekts stieß ich auf eine Publikation, die mein Leben veränderte: Im Jahr 1985 schilderte die Gruppe von Sol Snyder mögliche Mechanismen der Geruchserkennung. Ich hatte mich vorher nie auf diese Weise mit dem Geruchssinn beschäftigt und war fasziniert. Wie können Menschen und andere Säugetiere die Gerüche von 10000 oder mehr Chemikalien wahrnehmen, und wie können nahezu identische Chemikalien unterschiedliche Geruchsempfindungen auslösen? Ich stand vor einem beispiellos komplexen Problem. Mir war klar, dass man zur Lösung des Rätsels an der Frage ansetzen musste, wie Geruchsstoffe in der Nase erfasst werden. Es galt also, die Geruchsrezeptoren zu identifizieren, eine Molekülklasse, deren Existenz vermutet, aber noch nicht nachgewiesen worden war. Sofort nach Abschluss meiner Arbeit über die Neuropeptide würde ich mich dieser Aufgabe zuwenden!

Ich blieb in Richards Gruppe, als ich 1988 die Suche nach den Geruchsrezeptoren begann. Kürzlich beschrieb ich in einem Kommentar in *Cell*, was man zu dieser Zeit über die Geruchswahrnehmung wusste und welche Ansätze ich bei der Suche nach den Geruchsrezeptoren verfolgte. Kurz, es war bekannt, dass Geruchsstoffe Riechzellen in der Nase depolarisieren und dabei aktivieren. Es gab mehrere Vorschläge dazu, welche Moleküle mit Geruchsstoffen wechselwirken könnten, als gesichert galt aber die Beteiligung einer G-Protein-induzierten Anstiegs des cAMP-Spiegels bei der olfaktorischen Wahrnehmung. Nach einigen Anläufen identifizierte ich die Familie der Geruchsrezeptoren. Die entsprechenden Experimente fußten auf drei Annahmen: Da die Strukturen von Geruchsstoffen variieren, diese Unterschiede aber erkannt werden, müsste es erstens eine Familie unterschiedlicher, aber verwandter Rezeptoren geben, die durch eine umfangreiche Genfamilie codiert werden. Zweitens müssten Geruchsrezeptoren wenigstens entfernt mit der relativ kleinen Gruppe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren verwandt sein, deren Sequenzen bereits bekannt waren. Drittens müssten Geruchsrezeptorgene selektiv im Riechepithel exprimiert werden, in dem sich die Riechzellen befinden.

Es dauerte eine Weile, bis ich die Verfahren entwickelt hatte, die ich bei meiner Suche einsetzen wollte, am Ende hatte ich aber Erfolg. Bei der Betrachtung der ersten, aus Ratten erhaltenen Sequenzen von Geruchsrezeptoren war ich erstaunt über den Erfindungsreichtum der Natur: In Ratten codiert eine umfangreiche Genfamilie mehr als 100 unterschiedliche Geruchsrezeptoren, die alle verwandt, aber auch einzigartig sind. Die beispiellose Größe und Vielfalt dieser Familie erklärte, warum Säugetiere eine riesige Anzahl unterschiedlicher Gerüche wahrnehmen können. 1991 beschrieben Richard Axel und ich die Identifizierung der Geruchsrezeptoren in einer Veröffentlichung.

BOSTON

Im gleichen Jahr wurde ich Assistant Professor am Institut für Neurobiologie der Harvard Medical School in Boston. Dort tauchte ich in eine Welt ein, in der ich mein Wissen über das Nervensystem erweitern konnte. Ich erhielt hervorragende Starthilfe durch den Institutsdirektor Gerry Fischbach. Unter den vielen namhaften Kollegen war auch David Hubel, dessen bahnbrechende Untersuchungen zum visuellen System (für die Torsten Wiesel und er 1981 einen Nobelpreis erhielten) ich stets bewundert hatte. 1994 wurde ich Investigator am Howard Hughes Medical Institute, das unsere Forschungen in den vergangenen elf Jahren großzügig unterstützt hat. Während der nächsten zehn Jahre blieb ich in Harvard und wurde zum Associate Professor und dann zum Full Professor berufen. 1994 traf ich Roger Brent, einen wunderbaren Kollegen, der seitdem mein Lebenspartner ist.



(Photo: Roland Morgan)

Mit der Entdeckung der Geruchsrezeptoren war klar, wie das olfaktorische System Geruchsstoffe erkennt. Als nächstes wollte ich aufklären, wie diese Rezeptorsignale im Gehirn verarbeitet werden und Geruchsempfindungen entstehen. Dabei unterstützten mich einige hervorragende Studenten und Postdoktoranden. Die von der Nobel-Stiftung gewürdigten Entdeckungen über das olfaktorische System wurden während dieser zehn Jahre in Harvard gemacht.

Zuerst fragten wir uns, wie die Geruchsrezeptoren im Riechepithel der Nase verteilt sind. Diese Untersuchung wurde von meinem Diplomanden Kerry Ressler im Januar 1992 begonnen, als wir noch dabei waren, das Labor auszustatten. Ich hatte Mäuse statt Ratten als Modellorganismus ausgewählt, weil die Verwendung isogener Inzucht-Stämme die Suche nach einer Multigenfamilie erleichtern sollte. Außerdem konnten so transgene Versuchstiere gezüchtet werden. Nach dem Klonen und Sequenzieren einiger Rezeptorgene führte Kerry unsere ersten In-situ-Hybridisierungen durch, um Muster in der Rezeptorgen-Expression zu untersuchen. Ab Juni arbeitete Kerry dann Vollzeit, und mit Susan

Sullivan hatte meine erste Postdoktorandin angefangen. Wir begannen, die Genexpressionsmuster genau zu analysieren und die Ergebnisse für mehrere Individuen zu vergleichen. Vor der Erfindung der Digitalfotografie war das eine mühsame Arbeit, bei der Dias projiziert und die Lagen einzelner markierter Zellen auf Folien übertragen wurden. Wir stellten fest, dass jedes Rezeptorgen von etwa einem Promille der Riechzellen exprimiert wird und dass im Riechepithel mehrere räumlich getrennte Zonen vorliegen, in denen unterschiedliche Sätze von Rezeptorgenen exprimiert werden. Außerdem sind die Neuronen mit demselben Rezeptor über eine Zone verstreut. Dies ließ auf eine Aufteilung der Signale unterschiedlicher Rezeptoren auf unterschiedliche Riechzellen und eine unabhängige Weiterleitung ins Gehirn schließen. Ferner sind Neuronen, die den gleichen Geruchsstoff registrieren, vermutlich über das Riechepithel verstreut, und Neuronen für unterschiedliche Geruchsstoffe befinden sich nebeneinander. Sinnesinformationen sind im Epithel also in Zonen eingeteilt, insgesamt wird die Information aber weitläufig verteilt codiert. Wir veröffentlichten diese Ergebnisse im Jahr 1993; im gleichen Jahr berichteten Richard Axel und seine Kollegen über ähnliche Befunde an Ratten.

Anschließend fragten wir uns, was mit den Rezeptorsignalen aus der Nase geschieht, wenn sie in die nächste Station des olfaktorischen Systems, das Riechhirn, weitergeleitet werden. Dort bilden die Axone der Riechneuronen in etwa 2000 sphärischen Strukturen, den Glomeruli, Synapsen aus. Kerry untersuchte zunächst mit retroviralen Vektoren die Verteilung der Riechneuronen im Riechhirn, wir fanden dann aber zufällig einen anderen Weg. Susan setzte die In-situ-Hybridisierung ein, um einige Rezeptorgene aus jedem Epithelbereich für eine Chromosomenkartierung zu identifizieren. Dabei entdeckte sie in einem Gewebeschnitt, dass eine Rezeptorsonde einen einzelnen Punkt im Riechhirn markierte, der sich als ein Glomerulus herausstellte. Sonden, die einzelne Rezeptorgene statt Familien verwandter Gene erkannten, markierten dabei jeweils die mRNA von Geruchsrezeptoren in Riechzellen, die in einem oder wenigen Glomeruli an nur jeweils einer Stelle auf jeder Seite des Riechhirns konzentriert waren. Unterschiedliche Sonden markierten unterschiedliche Glomeruli und diese befanden sich bei allen Versuchstieren an nahezu identischen Stellen. Ich erinnere mich immer noch an ein Gespräch mit Kerry und Susan, bei dem ich Kerry fragte, wie viele Schnitte zwischen den unterschiedlich markierten Glomeruli in den einzelnen Versuchstieren lagen. Wir waren alle über seine Antwort erstaunt, weil sie den ersten Hinweis auf eine Musterkarte der Rezeptorsignale im Riechhirn lieferte, und wir uns nicht vorstellen konnten, wie diese angesichts des Verteilungsmusters der Genexpression im Epithel entstehen könnte. Dieses Rätsel ist immer noch ungelöst. Die Axone von Tausenden im Epithel verteilten Neuronen, die das gleiche Rezeptorgen exprimieren, treffen sich im Riechhirn in wenigen spezifischen Glomeruli. Das Ergebnis ist eine Musterkarte von Rezeptorsignalen, bei der Signale unterschiedlicher Rezeptoren getrennt von unterschiedlichen Glomeruli empfangen und von den Projektionsneuronen weitergeleitet werden, deren Dendriten diese Glomeruli innervieren. In der Gruppe

von Richard Axel hatte Bob Vassar gleichzeitig entdeckt, dass auch bei Ratten unterschiedliche Rezeptorsonden jeweils andere Glomeruli im Riechhirn markierten. Unsere Gruppen berichteten 1994 über diese Ergebnisse.

Einige Jahre später begannen wir zu untersuchen, wie die Rezeptorfamilien und das Muster der Rezeptorsignale die Identität von Geruchsstoffen codieren. Mithilfe von Einzell-RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion) hatte meine Mitarbeiterin Bettina Malnic die Genexpression einzelner Riechzellen verglichen. Wie wir bereits vermutet hatten, exprimiert jedes Neuron nur ein einziges Rezeptorgen. Bettina konzentrierte sich anfangs auf die Suche nach Genen, die an der Selektion der Rezeptorgene oder der Axonlenkung im Riechhirn beteiligt sein könnten. Als Takaaki Sato unsere Gruppe besuchte und über seine Calcium-Bildgebungsuntersuchungen der Geruchsantwort im Riechepithel berichtete, entschieden wir uns, den Kurs zu ändern. Dies war der Anfang einer äußerst erfolgreichen Zusammenarbeit: Takaaki bestimmte anhand von Calcium-Bildgebung die Antwortprofile einzelner Neuronen auf Gerüche, und Bettina klärte dann durch RT-PCR auf, welche Rezeptorgene jedes responsive Neuron exprimiert. Diese Befunde maßen den Rezeptorkombinationen eine entscheidende Rolle zu. Unterschiedliche Neuronen werden durch jeweils andere Rezeptorkombinationen angesprochen, jeder Rezeptor ist aber Bestandteil des kombinatorischen Rezeptorcodes für zahlreiche Geruchsstoffe. Die Ergebnisse erklärten einige interessante Merkmale menschlicher Geruchsempfindung, so die Frage, warum eine geringe Strukturänderung den wahrgenommenen Geruch drastisch wandeln kann.

Nachdem wir die Vorgänge im Riechhirn besser kannten, wandten wir uns der nächsten Station des olfaktorischen Systems, der Riechrinde, zu. Meine Doktorandin Lisa Horowitz untersuchte die Verbindung zwischen dem Riechhirn und der Riechrinde zunächst mit klassischen anatomischen Methoden. Sie platzierte Tracer in den dorsalen und ventralen Teilen des Riechhirns und stellte fest, dass beide Areale Axone in die gleichen Regionen der Hirnrinde entsenden. Dies bestätigte frühere Resultate, die gegen ein Punkt-zu-Punkt-Verbindungsmuster zwischen Riechhirn und Riechrinde sprachen. Wir versuchten dann, die neuronale Signalweiterleitung auch genetisch zu kartieren, indem wir ein Gen zur Expression eines transneuronalen Tracers in Riechzellen einschleusten. Lisa gelang dies mit transgenen Mäusen, die Gerstenlektin in allen Riechzellen produzierten. Das Lektin überquerte zwei Synapsen und markierte dabei Neuronen zweiter Ordnung im Riechhirn und dritter Ordnung in der Riechrinde. Die Ergebnisse, über die wir 1999 berichteten, beantworteten viele Fragen zu neuronalen Schaltkreisen, nicht nur in Bezug auf Geruchsinformationen.

Auch zur Untersuchung der Riechrinde setzten wir genetische Tracer ein. Durch Gen-Targeting erhielten wir transgene Mäuse, die Gerstenlektin zusammen mit einem einzelnen Rezeptorgen exprimierten. Lisa und mein Mitarbeiter Jean-Pierre Montmayeur synthetisierten dazu künstliche DNA-Fragmente. Zhihua Zou experimentierte dann an Mäusen, die den Tracer zusammen mit unterschiedlichen Rezeptorgenen produzierten. Das Verfahren war schwierig,

und Zhihua verbrachte fast ein Jahr damit, die Bedingungen zu perfektionieren, unter denen sich kleinste Tracermengen in Neuronen der Riechrinde nachweisen ließen. Schließlich konnten wir zeigen, dass es auch in der Riechrinde eine Musterkarte eingehender Rezeptorsignale gibt, die sich allerdings von derjenigen des Riechhirns grundsätzlich unterscheidet. Statt einer Aufteilung der Rezeptorsignale auf Glomeruli und Neuronen wie im Riechhirn werden die Signale in der Riechrinde in komplexer Weise in partiell überlappenden Gebieten verarbeitet. Einzelne Neuronen der Rinde scheinen Signale von Kombinationen aus mehreren Rezeptoren zu empfangen. Dadurch werden Elemente des Rezeptorcodes eines Geruchsstoffs von einzelnen Neuronen integriert. Dies könnte der erste Teilschritt bei der Rekonstruktion eines Geruchsbilds aus den Bestandteilen des Codes sein. Wir veröffentlichten die Ergebnisse über die Riechrinde im Jahr 2001.

Während der zehn Jahre in Harvard untersuchten wir auch eine Reihe anderer Fragen. So erforschte Susan Sullivan die chromosomale Verteilung der Geruchsrezeptorgene und die Evolution der Rezeptorgenfamilie, Susan und Staffan Bohm studierten die Entwicklung von Rezeptorgen-Expressionsmustern, und Bettina Malnic und Paul Godfrey verglichen in bioinformatischen Analysen die Geruchsrezeptorgen-Repertoires von Mensch und Maus. Wir untersuchten außerdem die Wahrnehmung von Pheromonen im Vomeronasalorgan. Emily Liman und Anna Berghard entdeckten Unterschiede zwischen den Überträgermolekülen bei der Geruchs- und Pheromonwahrnehmung, Anna bestimmte ferner die Zonenverteilung von Überträgermolekülen, die wahrscheinlich an der Pheromonwahrnehmung beteiligt sind. Mehran Sam analysierte die Reaktion des Vomeronasalorgans auf Pheromone und Geruchsstoffe, und Hiroaki Matsunami entdeckte eine Gruppe von Strukturen, die als Pheromonrezeptoren infrage kommen. Gegen Ende unserer Zeit in Harvard begannen Hiroaki Matsunami, Jean-Pierre Montmayeur und Stephen Liberles auch, die Mechanismen bei der Geschmackswahrnehmung zu untersuchen; gleichzeitig mit anderen Gruppen entdeckten sie dabei mögliche Rezeptoren für bitteren und süßen Geschmack.

SEATTLE

Im Jahr 2002 kehrte ich nach Seattle zurück und schloss mich der Division of Basic Sciences am Fred Hutchinson Cancer Research Center an. Ich wurde außerdem Affiliate Professor of Physiology and Biophysics an der University of Washington. Ich hatte immer vorgehabt, an die Westküste zurückzukehren, und war schon länger als erwartet in Boston geblieben. Als Mark Groudine, der damalige Direktor der

Basic Sciences Division am Hutchinson Center, mir eine Stelle anbot, nahm ich daher freudig an. Das Zentrum hatte den Ruf, Spitzenforschung zu betreiben und gleichzeitig eine sehr kollegiale Atmosphäre zu bieten. Dies beides war mir wichtig – und ferner würde ich durch den Umzug meinem Partner Roger, der in Berkeley lebt, meiner Familie und meinen Freunden in Seattle näher sein.

In Seattle führen wir die Untersuchungen zur Geruchswahrnehmung fort, und wir studieren weiter, wie Pheromone instinktives Verhalten auslösen. Wir erforschen inzwischen auch die neuronalen Schaltkreise, die angeborenem Verhalten und elementaren Trieben wie Angst, Appetit und Reproduktion zugrunde liegen. Gegenwärtig entwickeln wir molekularbiologische Techniken zur Suche dieser Schaltkreise, der beteiligten Neurone und der Gene, die von ihnen exprimiert werden. Eine andere Zielsetzung verfolgen wir mit einem Hochdurchsatzverfahren, bei dem wir Chemikalienbibliotheken zur Identifizierung derjenigen Gene einsetzen, die die Alterung steuern. Dabei beschäftigt uns hauptsächlich eine Frage: Gibt es einen zentralen Mechanismus, der die Lebensdauer bestimmt und die Alterung von Zellen im gesamten Körper reguliert?

Rückblick

Seit Richard Axel und ich 1991 über die Entdeckung der Geruchsrezeptoren berichteten, haben viele Arbeitsgruppen diese Rezeptoren zur genauen Analyse der Mechanismen des Geruchssinns und der Entwicklungsprozesse im olfaktorischen System eingesetzt. Diese Art der Anerkennung hat mir Freude bereitet. Molekularbiologische Methoden zur Untersuchung der Geruchswahrnehmung sind auf andere Wirbeltiere und Wirbellose ausgedehnt worden. So hat Cori Bargmann in der Nematode *C. elegans* eine große Zahl von Chemosensoren entdeckt, und einige Gruppen, einschließlich der von Richard Axel, identifizierten Familien von Geruchs- und Geschmacksrezeptoren in der Fruchtfliege *D. melanogaster*.

Es ist kaum zu fassen, welches Glück ich hatte, als ich Wissenschaftlerin wurde. Nur sehr wenige Menschen haben jeden Tag die Gelegenheit, das zu tun, was sie lieben. In Zusammenarbeit mit wunderbaren Mentoren, Kollegen und Studenten durfte ich faszinierende Fragestellungen untersuchen und mich an den Entdeckungen erfreuen. Für all dies bin ich dankbar – und ich bin gespannt darauf, welche Geheimnisse die Natur als nächstes preisgeben wird.

Ich hoffe aufrichtig, dass die Vergabe des Nobelpreises an mich als eine Wissenschaftlerin junge Frauen auf der ganzen Welt ermutigen wird, ihren Träumen zu folgen – ihnen stehen alle Möglichkeiten offen.

1. Einleitung

Mein Vortrag dreht sich um den Geruchssinn, einen der fünf Sinne, mit denen wir die Welt erfassen. Der Geruchssinn von Menschen und Säugetieren kann eine immense Zahl unterschiedlicher Chemikalien aus der Außenwelt wahrnehmen. Schätzungsweise können wir Menschen 10000 bis 100000 Chemikalien am Geruch unterscheiden. Alle diese Geruchsstoffe sind kleine, flüchtige Moleküle. Ihre Strukturen variieren allerdings, und irgendwie werden diese Unterschiede als unterschiedliche Gerüche wahrgenommen (Abbildung 1).

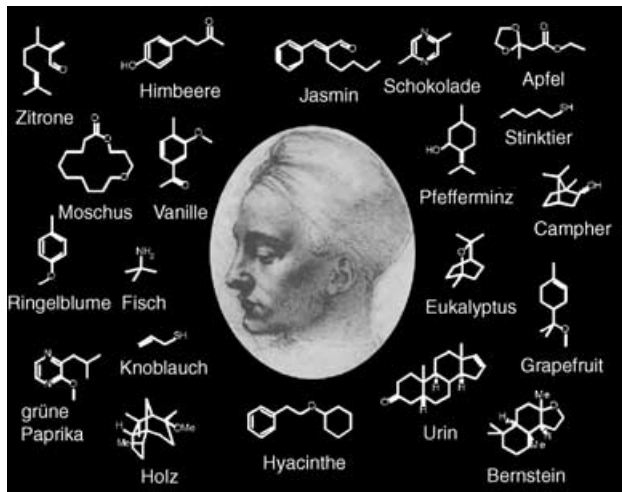


Abbildung 1. Menschen und andere Säugetiere können eine riesige Zahl von Chemikalien am Geruch unterscheiden.

Der Sinneseindruck eines Geruchs wird vom olfaktorischen System vermittelt, das durch eine vorzügliche Empfindlichkeit und Unterscheidungsfähigkeit besticht. Schon eine geringfügige Strukturänderung eines Geruchsstoffs kann sich auf die Geruchsempfindung auswirken. Beispielsweise kann eine Chemikalie nach Birnen riechen, während eine eng verwandte Verbindung einen Apfelduft aufweist. Das olfaktorische System nimmt nicht nur Geruchsstoffe, sondern auch Pheromone wahr. Diese werden von Tieren freigesetzt und wirken auf Artgenossen, indem sie hormonelle Veränderungen stimulieren oder instinktives Verhalten wie Paarung oder Aggression auslösen. Das olfaktorische System erkennt auch den Geruch von Fressfeinden, der eine angeborene Angstreaktion auslöst.

In den vergangenen 16 Jahren konzentrierte sich unsere Arbeit auf zwei Fragen: Wie nehmen Säugetiere so viele unterschiedliche Chemikalien in der Umgebung wahr? Und wie übersetzt das Gehirn dies in so vielfältige Geruchsempfindungen und Verhaltensweisen?

Geruchsstoffe werden zunächst von Riechzellen im Riechepithel der Nasenhöhle wahrgenommen (Abbildung 2). Diese Neuronen übermitteln Signale an das Riechhirn (Bulbus Olfactorius oder Riechkolben), das die Signale dann an die Riechrinde, auch olfaktorischer Cortex genannt, weiterleitet. Von dort wird die Geruchsinformation an andere



Abbildung 2. Der Weg der Geruchsinformationen: Geruchsstoffe werden im Riechepithel von Riechzellen wahrgenommen. Die entstehenden Signale werden von den Neuronen über das Riechhirn und die Riechrinde in andere Gehirnareale weitergeleitet.

Gehirnbereiche weitergeleitet. Dazu zählen höhere cortikale Hirnbezirke, von denen man annimmt, dass sie an der Unterscheidung von Gerüchen beteiligt sind, und tiefe limbische Areale des Gehirns, die vermutlich emotionale und physiologische Reaktionen auf Gerüche auslösen. Im Unterschied dazu werden Pheromone hauptsächlich im Vomeronasalorgan (VNO) erkannt, einer eigenständigen olfaktorischen Einheit im Septum nasale. Von den VNO-Neuronen werden die Signale über einen Verbindungsknoten an den medialen Mandelkern (Amygdala) und dann zum Hypothalamus weitergeleitet; diese Bereiche wirken an der hormonalen und der Verhaltensreaktion auf Pheromone mit.

Das Riechepithel enthält Millionen von Riechzellen, daneben Hilfszellen und basal eine Stammzellschicht. Die Riechzellen sind kurzlebig und werden kontinuierlich von der Stammzellschicht neu gebildet. An der Oberfläche des Epithels reichen von jedem Neuron Cilien in den Schleimfilm hinein, der die Nasenhöhle auskleidet. Diese Cilien treten mit Geruchsstoffen in Kontakt, die im Nasenschleim gelöst sind. Jedes Neuron kommuniziert mit dem Gehirn über ein einzelnes Axon, das bis ins Riechhirn reicht.

2. Geruchsrezeptoren

In unseren ersten Experimenten untersuchten Richard Axel und ich, wie diese Neuronen Geruchsstoffe wahrnehmen. Seit den Arbeiten von Robert Gesteland^[1] im Jahre 1965 hatten zahlreiche elektrophysiologische Untersuchungen gezeigt, dass unterschiedliche Riechzellen durch unterschiedliche Geruchsstoffe depolarisiert, oder aktiviert, werden. Wie John Amoore vermutete, weisen diese Neuronen Rezeptorproteine für Geruchsstoffe auf, die sich in ihrer Affinität für die einzelnen Geruchsstoffe unterscheiden.^[2,3] Ab Mitte der achtziger Jahre wurden Hinweise auf die Signaltransduktion in den Cilien von Riechneuronen entdeckt. Doron Lancet, Sol Snyder und ihre Kollegen wiesen nach, dass Geruchsstoffe eine GTP-abhängige Zunahme der Adenylylcyclase-Aktivität in den Cilien induzieren. Dies deutet auf die Beteiligung intrazellulärer G-Proteine hin,^[4,5] und Randy Reed identifizierte G α olf, ein G-Protein, das diese Reaktion auslösen kann und in Riechzellen stark exprimiert wird.^[6]

1988 begannen Richard Axel und ich mit der Suche nach Geruchsrezeptoren. Unsere Strategie fußte auf drei Annahmen: Zum einen müssten Geruchsrezeptorgene selektiv im Riechepithel exprimiert werden. Zweitens müsste es eine Familie einzigartiger, aber verwandter Rezeptoren geben (weil die Struktur von Geruchsstoffen variiert), die durch eine umfangreiche Genfamilie codiert wird. Drittens müssten Geruchsrezeptoren mit anderen Rezeptortypen verwandt sein, die mit intrazellulären G-Proteinen wechselwirken. Bis 1989 waren durch molekulares Klonen die Strukturen von etwa 20 dieser G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) aufgeklärt worden. Alle diese Rezeptoren wiesen sieben potenzielle Transmembrandomänen und einige gemeinsame Aminosäuresequenzen auf.

Wir nahmen dann die Suche nach einer Familie von GPCRs auf, die im Riechepithel von Ratten exprimiert werden.^[7] Dazu bedienten wir uns zunächst der Polymerasekettenreaktion (PCR) und suchten nach Rezeptoren, die mit bekannten GPCRs verwandt sind. Wir entwickelten elf entartete Oligonucleotidprimer, die zu Aminosäuresequenzen in den Transmembrandomänen 2 und 7 bekannter GPCRs passten. Alle 30 Zweierkombinationen dieser Primer setzten wir dann zur Vervielfältigung verwandter cDNA-Sequenzen ein, die aus RNA aus dem Riechepithel von Ratten hergestellt worden waren. Aus diesen 30 PCR-Ansätzen erhielten wir im geeigneten Größenbereich 64 unterschiedliche Produkte, die in einer Agarose-Gelelektrophorese jeweils eine eigene Bande lieferten.

Wir untersuchten dann, ob irgendeines der 64 PCR-Produkte mehrere Mitglieder einer Multigenfamilie enthielt. Dazu schnitten wir die DNA aller Sonden mit einem Restriktionsenzym. Die meisten Banden wurden in eine kleine Zahl von Fragmenten zerteilt, die Bande Nr. 13 wurde hingegen in zahlreiche Stücke gespalten, sodass wir vermuteten, sie könnte mehrere Mitglieder einer Multigenfamilie enthalten. Nachdem wir fünf der DNAs in dieser Bande geklont und sequenziert hatten, entdeckten wir, wonach wir gesucht hatten: Alle fünf codierten bislang unbekannte Proteine mit GPCR-Merkmalen. Ferner waren alle fünf unterschiedlich, aber miteinander verwandt.

Mit diesen DNAs als Sonden isolierten wir eine Reihe verwandter cDNAs aus einer cDNA-Bibliothek des Riechepithels. Zunächst untersuchten wir die Proteine, die durch zehn der cDNA-Moleküle codiert werden. Alle zehn Proteine wiesen die sieben potenziellen Transmembrandomänen auf, die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren charakteristisch sind. Weiterhin traten einige der Aminosäuresequenzen auch in anderen GPCRs auf. Allen zehn Rezeptoren waren aber auch Sequenzen gemein, die in keinem anderen GPCR vorhanden sind, was auf ihre Zugehörigkeit zu einer neuartigen Rezeptorfamilie hindeutete.

In Abbildung 3 ist einer dieser Membranrezeptoren schematisch wiedergegeben. Die einzelnen Aminosäuren sind als Kugeln dargestellt: Rote Kugeln stehen für Aminosäuren, die bei den zehn Rezeptoren besonders variabel waren – denn die zehn Geruchsrezeptoren variierten trotz ihrer Ähnlichkeit stark in den Aminosäuresequenzen. Diese „Hypervariabilität“ ist in Einklang mit der Fähigkeit der Rezeptoren zur

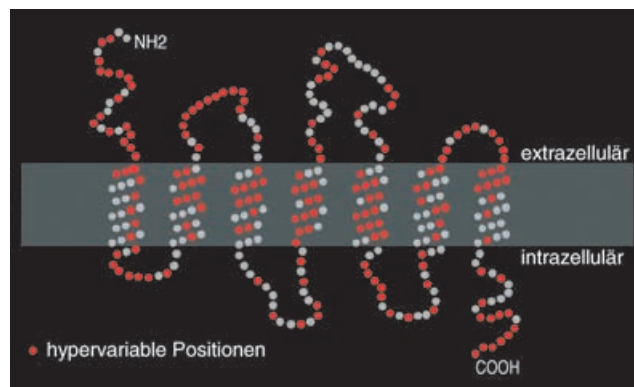


Abbildung 3. Topologie eines Geruchsrezeptors in einer Membran: Aminosäurereste sind als Kreise dargestellt; rote Kreise stehen für Aminosäuren, die sich beim Vergleich von zehn Geruchsrezeptoren als hypervariabel erwiesen haben. Entnommen aus Lit. [7] und modifiziert.

Wechselwirkung mit Geruchsstoffen mit unterschiedlichen Strukturen.

In Übereinstimmung mit der selektiven Expression dieser Rezeptorgene im Riechepithel hybridisierte eine Sonde aus der DNA verschiedener Geruchsrezeptoren mit RNA aus dem Riechepithel, nicht aber mit solcher aus anderen Geweben. Ferner lieferte eine größere Zahl von Riechzellen auch eine größere Menge an Rezeptor-RNA, was auf eine überwiegende oder ausschließliche Expression der Rezeptorgene durch die Riechzellen hinweist.

In Southern-Blot-Experimenten mit Genom-DNA hybridisierten einzelne Rezeptorgene mit einigen Banden, und eine gemischte Rezeptorgensonde mit vielen Banden. Dies war ein weiteres Indiz für die Codierung der entdeckten Rezeptoren durch eine große Genfamilie. Screenings der Genombibliothek deuteten auf mehr als 100 Mitglieder in dieser Multigenfamilie hin. Später konnten wir bei Mäusen sogar etwa 1000 unterschiedliche Geruchsrezeptorgene nachweisen.

Aus diesen Ergebnissen folgerten wir, dass die entdeckte Genfamilie Geruchsrezeptoren (Odorant Receptors, ORs) codiert, die durch Riechzellen in der Nase exprimiert werden.^[7] Anschließend Untersuchungen belegten, dass Vertebraten (Wirbeltiere) – vom Fisch bis zum Menschen – über homologe Familien von Geruchsrezeptoren verfügen.^[8] Im Jahr 1991, nach der Publikation unsere Ergebnisse über Geruchsrezeptoren,^[7] verließ ich die Arbeitsgruppe von Richard Axel und wechselte an die Harvard Medical School.

Zehn Jahre später ermöglichte die Sequenzierung des Genoms von Mensch und Maus die Bestimmung der Zahl von Geruchsrezeptorgenen in diesen Arten. Dies nahmen Lancet und Zozulya für Menschen^[9,10] und Firestein und Trask für Mäuse vor,^[11,12] und in meiner Gruppe arbeiteten Bettina Malnic und Paul Godfrey an beiden Spezies.^[13,14] Alle Ergebnisse deuten auf etwa 350 unterschiedliche Geruchsrezeptoren beim Menschen und etwa 1000 bei Mäusen hin. Grob geschätzt dienen also 1–5 % der Gene in den Genomen dem Nachweis von Geruchsstoffen. Geruchsrezeptorgene verteilen sich über das gesamte Genom: Beim menschlichen

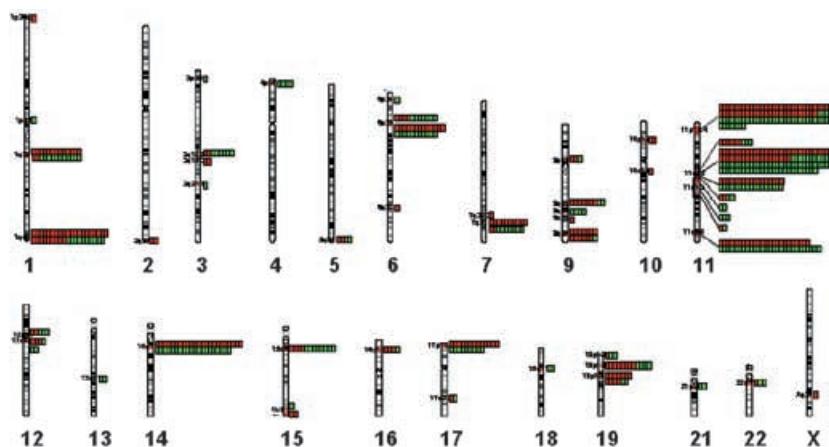


Abbildung 4. Verteilung menschlicher Geruchsrezeptorgene auf die Chromosomen. Intakte Rezeptorgene sind rot wiedergegeben, Pseudogene grün. Entnommen aus Lit. [14] und modifiziert.

Genom wiesen wir Geruchsrezeptorgene auf 21 Chromosomen und an 51 unterschiedlichen Loci nach, wo sie einzeln oder in Clustern auftreten (Abbildung 4).^[14]

Mitte der neunziger Jahre wurden zwei weitere Rezeptorfamilien im olfaktorischen System entdeckt: V1R und V2R. Diese Rezeptoren sind bezüglich ihrer Aminosäuresequenz nicht mit den Geruchsrezeptoren verwandt, weisen aber ebenfalls die charakteristischen sieben Transmembrandomänen der GPCR-Rezeptoren auf. Die V1R- und V2R-Gene werden selektiv im VNO exprimiert, was eine Codierung von Pheromon-Rezeptoren nahe legt. Beide Rezeptorfamilien umfassen mehr als 100 Mitglieder. Die V1R-Genfamilie wurde 1995 durch Dulac und Axel nachgewiesen,^[15a] die V2R-Genfamilie wurde 1997 in meiner Gruppe von Hiroaki Matsunami sowie durch die Arbeitsgruppen von Catherine Dulac und Nicholas Ryba entdeckt.^[15b,16,17]

3. Die Verteilung der Geruchsrezeptoren im Riechepithel

Nach dem Nachweis der Geruchsrezeptoren war klar, wie das olfaktorische System eine so große Zahl von Chemikalien in der Außenwelt erkennt. Gleichzeitig konnte anhand der Geruchsstoffmoleküle untersucht werden, wie das Nervensystem chemische Strukturen in Geruchsempfindungen übersetzt. In Harvard angekommen, begannen wir, uns damit zu beschäftigen.

Bei Mäusen konnten wir mehr als 1000 unterschiedliche Geruchsrezeptorgene nachweisen. Zunächst untersuchten wir, wie sich die unterschiedlichen Geruchsrezeptoren im Riechepithel verteilen.^[18] Kerry Ressler, ein Student, und Susan Sullivan, eine Postdoktorandin, führten zu diesem Zweck Hybridisierungsexperimente mit markierten Geruchsrezeptorgensonden an Schnitten durch die Mäusenase aus (Abbildung 5). Die Ergebnisse zeigten, dass in räumlich getrennten Arealen im Riechepithel nichtüberlappende Sätze von Geruchsrezeptorgenen exprimiert werden (Abbildung 6). Jedes Rezeptorgen wird in etwa einem Promille der

Neuronen exprimiert, und diese Neuronen sind innerhalb eines Bereichs zufällig verteilt; Richard Axels Arbeitsgruppe wies ähnliches auch für Ratten nach.^[19] Die Bereiche bilden Streifen, die sich entlang der Längsachse des Nasenhöhlen erstrecken.

Aus diesen Resultaten ergeben sich zwei wichtige Befunde: Erstens sind die Geruchsrezeptoren eines Typs, von denen eine gemeinsame Reizantwort ausgeht, weit über das Epithel verstreut. Neuronen mit Rezeptoren für einen Geruchsstoff (z. B. aus Erdbeeren) müssen durchsetzt sein mit Neuronen, die Rezeptoren für andere Geruchsstoffe (z. B. aus Zitronen) enthalten. Zweitens kann jedes Neuron nur ein Geruchsrezeptorgen exprimieren. Wir bewiesen dies später durch die Untersuchung der Genexpression in einzelnen Neuronen.^[20] Das Signal der Reizung unterschiedlicher Geruchsrezeptoren wird in der Nase daher an jeweils andere Neuronen übergeben, und die

Information, die jedes Neuron ans Gehirn übermittelt, stammt von einem einzigen Rezeptortyp.

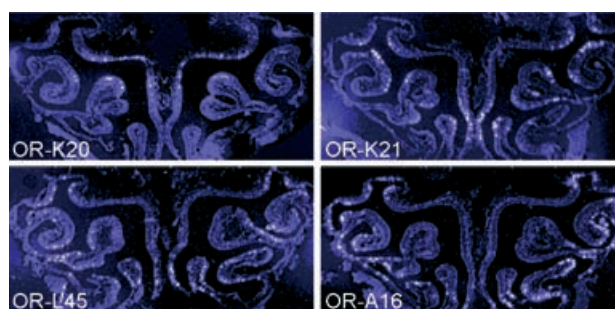


Abbildung 5. Expressionsmuster von Geruchsrezeptorgenen im Riechepithel von Mäusen. Gewebeschnitte durch die Mäusenase wurden mit vier unterschiedlichen Rezeptorgensonden hybridisiert. Entnommen aus Lit. [18,30] und modifiziert.

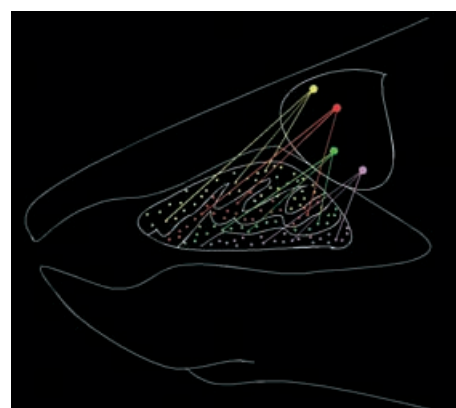


Abbildung 6. Verteilungsmuster eingehender Signale von Geruchsrezeptoren in Riechepithel und Riechhirn. Riechzellen, die denselben Rezeptortyp exprimieren, sind über eine Zone des Epithels verstreut, ihre Axone treffen sich aber in bestimmten Glomeruli im Riechhirn. Entnommen aus Lit. [18,22,30] und modifiziert.

4. Kombinatorische Rezeptorcodes für Gerüche

Später fragten wir uns, wie die Geruchsrezeptorfamilie Geruchsstoffe codiert. Wir suchten dazu nach Rezeptoren, die spezifische Geruchsstoffe erkennen.^[20] Bei diesen Studien arbeitete Bettina Malnic aus meiner Gruppe mit Takaaki Sato und Junzo Hirono am Life Electronics Research Center in Japan zusammen. Wir setzten zunächst einzelne Riechzellen von Mäusen einer Reihe von Geruchsstoffen aus und verfolgten ihre Reaktionen durch Calcium-Bildgebung. Anschließend isolierten wir jedes responsive Neuron und bestimmten durch Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), welche Rezeptorgene es exprimiert. Wir identifizierten pro Neuron stets nur einen Geruchsrezeptor, jedes Neuron exprimiert also nur ein einziges Geruchsrezeptorgen.

Für diesen Geruchsstofftest setzten wir vier Klassen linearer aliphatischer Geruchsstoffe mit variierenden funktionellen Gruppen und einer Kettenlänge zwischen 4 und 9 Kohlenstoffatomen ein. Jedes Neuron wurde fotografiert, während es nacheinander verschiedenen Geruchsstoffen ausgesetzt wurde (Abbildung 7). Trat eine Reaktion ein, so wurde das Neuron mit einer niedrigeren Konzentration des gleichen Geruchsstoffs nochmals untersucht.

Abbildung 8 gibt die Reaktionsprofile von 14 Neuronen wieder (und damit die Erkennungseigenschaften der Geruchsrezeptoren in diesen Neuronen). Die Daten liefern drei wichtige Ergebnisse: Zum einen kann jeder Geruchsrezeptor mehrere Geruchsstoffe erkennen; dies war bereits von Stuart Firestein

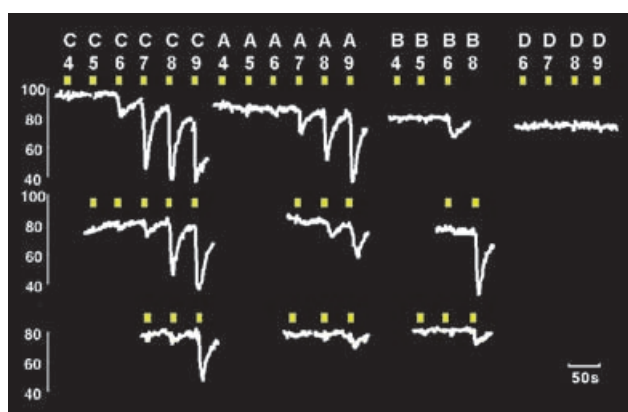


Abbildung 7. Reaktion einer einzelnen Riechzelle auf unterschiedliche Geruchsstoffe. Die Fluoreszenzemission wurde gemessen, während ein Neuron, das den Indikatorfarbstoff Fura-2 enthielt, nacheinander einer Reihe von Geruchsstoffen (C4–D9) ausgesetzt wurde. Reaktionen auf niedrigere Geruchsstoffkonzentrationen sind darunter gezeigt. Entnommen aus Lit. [20] und modifiziert.

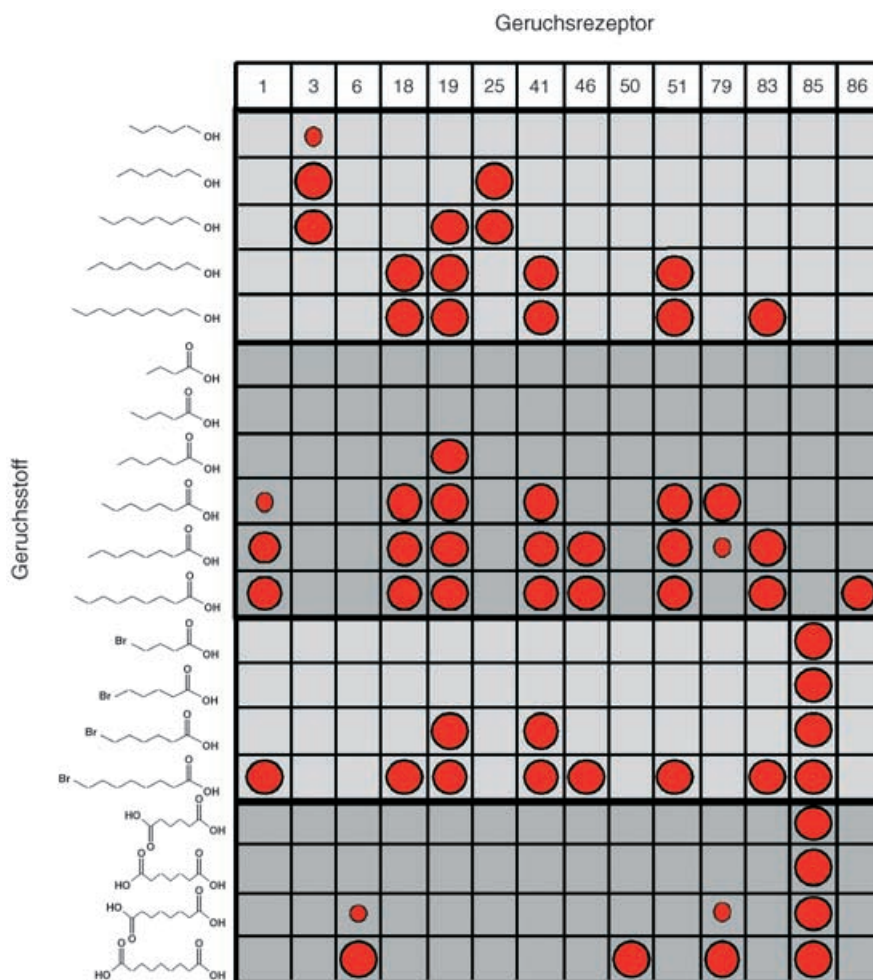


Abbildung 8. Die Reizung mehrerer Rezeptoren bildet die Grundlage der kombinatorischen Codierung einer Geruchsstoff-Identität. Die Erkennungsprofile einzelner Rezeptoren für verschiedene Geruchsstoffe wurden durch Calcium-Bildgebung und Einzell-RT-PCR gewonnen. Die Größe der Kreise entspricht der Intensität der Antwort. Entnommen aus Lit. [20] und modifiziert.

für einen Geruchsrezeptor von Ratten nachgewiesen worden.^[21] Zweitens kann jeder Geruchsstoff von mehreren Rezeptoren erkannt werden. Am Wichtigsten ist jedoch der Befund, dass unterschiedliche Geruchsstoffe von unterschiedlichen Rezeptorkombinationen erkannt werden.

Diese Resultate deuten auf eine kombinatorische Codierung der Geruchsstoffe durch die Rezeptoren hin.^[20] Die Geruchsstoffe werden also durch unterschiedliche Rezeptorkombinationen erkannt. Jeder Rezeptor ist wiederum Bestandteil des Codes zahlreicher Geruchsstoffe, und jeder Geruchsstoff hat einen eigenen „Rezeptorcode“. Mit 1000 unterschiedlichen Rezeptoren könnte ein solcher kombinatorischer Code zwischen einer nahezu unbegrenzten Zahl von Geruchsstoffen unterscheiden. Selbst wenn jeder Geruchsstoff von nur drei Rezeptortypen erkannt würde, könnte dieses Schema fast eine Milliarde Geruchscodes enthalten.

Die Untersuchungen erklärten auch einige verwirrende Besonderheiten der menschlichen Geruchsempfindung.^[20] Schon eine geringfügige Strukturänderung in einem Geruchsstoff kann dazu führen, dass ein – manchmal sogar drastisch – unterschiedlicher Geruch wahrgenommen wird. Die von uns

eingesetzten aliphatischen Säuren und Alkohole liefern ein ausgezeichnetes Beispiel (Abbildung 9). Alle Säuren haben unangenehme Gerüche wie ranzig, sauer oder schweißartig. Die Alkohole riechen dagegen angenehm nach Kräutern, Holz oder Orangen. Säuren und Alkohole, die sich nur in der funktionellen Gruppe unterscheiden, haben ausnahmslos unterschiedliche Rezeptorcodes (Abbildung 9).

GERUCHS-STOFF	1	3	6	18	19	25	41	46	50	51	79	83	85	86	GERUCH
Hexansäure															ranzig, sauer, nach Ziege
Hexanol															süß, nach Kräutern, Holz
Heptansäure															ranzig, sauer, süßlich
Heptanol															süß, nach Veilchen, Holz
Octansäure															ranzig, sauer, widerlich
Octanol															süß, nach Orange, Rose
Nonansäure															nussig, nach Wachs, Käse
Nonanol															frisch, blumig, nach Rose

Abbildung 9. Nahe verwandte Geruchsstoffe, die zu unterschiedlichen Geruchswahrnehmungen führen, werden durch andere Rezeptorkombinationen erkannt. Entnommen aus Lit. [20] und modifiziert.

Auch eine Konzentrationsänderung kann den Rezeptorcode eines Geruchsstoffs beeinflussen. Bei höheren Konzentrationen waren stets zusätzliche Rezeptoren an der Reaktion beteiligt. Dies könnte erklären, warum bei Änderung der Geruchsstoffkonzentration ein abweichender Geruch wahrgenommen werden kann.

5. Eine Musterkarte eingehender Geruchsrezeptorsignale im Riechhirn

Geruchsstoffe werden in der Nase also offenbar durch jeweils unterschiedliche Kombinationen von Rezeptoren erkannt, die letztlich zu den jeweiligen Geruchsempfindungen führen. Wie aber wird dieser kombinatorische Rezeptorcode in eine Wahrnehmung übersetzt?

Von jeder Sinneszelle im Riechepithel führt genau ein Axon bis ins Riechhirn. Dort endet dieses Axon in einer sphärischen Struktur, dem Glomerulus, wo es an den Dendriten von Hirnneuronen Synapsen ausbildet. Das Riechhirn der Maus enthält etwa 2000 Glomeruli, die jeweils Signale von einigen Tausend Riechzellen erhalten. Jede Riechzelle bildet nur in einem Glomerulus Synapsen aus. In ähnlicher Weise wird auch jede Mitralzelle im Riechhirn nur von einem Glomerulus angesprochen. Mitralzellen sind Relaisneuronen, die die Signale an die Riechrinde weiterleiten.

Die Situation im Riechhirn unterscheidet sich deutlich von derjenigen in der Nase.^[22] Nur in wenigen Glomeruli des Riechhirns markierten Gensonden für einzelne Rezeptoren die Rezeptor-mRNA von Sensoraxonen. Diese Glomeruli befanden sich außerdem an nur zwei Stellen auf beiden Seiten des Riechhirns (Abbildung 10a). Rezeptorgensonden anderer Geruchsstoffe markierten jeweils andere Glomeruli, die sich bei allen Individuen erstaunlicherweise an nahezu identischen Stellen waren (Abbildung 10b). Diese Entdeckungen

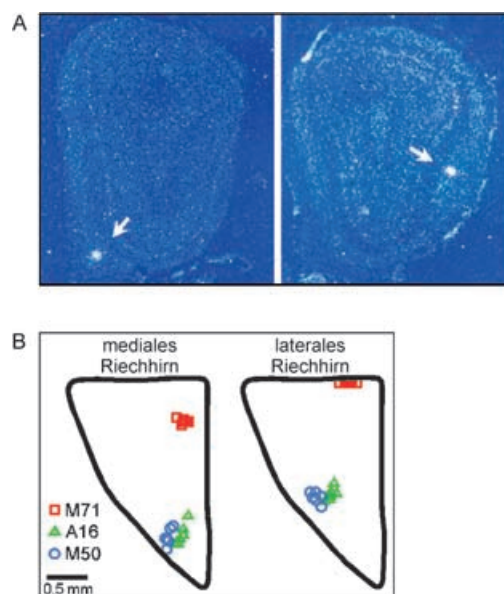


Abbildung 10. Musterkarte eingehender Geruchsrezeptorsignale im Riechhirn. A) Eine Sonde mit einem Rezeptorgen hybridisierte mit den Sensoraxonen in nur einem oder zwei Glomeruli in jeder Hälfte des Riechhirns. B) Unterschiedliche Rezeptorgensonden (A16, M50, M71) hybridisierten in jeweils anderen Glomeruli, und diese befanden sich in sechs Versuchstieren an ähnlichen Stellen.

wurden von Kerry Ressler und Susan Sullivan gemacht. Ähnliche Ergebnisse erhielten Vassar und Axel in Experimenten an Ratten, bei denen Rezeptorgensonden generell eine größere Zahl von Glomeruli an mehr Stellen im Riechhirn markierten.^[23]

Unsere Ergebnisse mit Mäusen deuten darauf hin, dass die Axone von Tausenden von Riechzellen mit demselben Geruchsrezeptor in nur 2–4 Glomeruli zusammentreffen, von denen jeder wahrscheinlich nur einem Geruchsrezeptor zugeordnet ist (Abbildung 10).^[22] Ferner werden Reize, die in der Nase grob unterteilt in vier Bereichen gesammelt werden, im Riechhirn offenbar in eine Musterkarte der Sinneswahrnehmung umgewandelt (Abbildung 6). Dabei gelangen eingehende Signale unterschiedlicher Rezeptoren zu unterschiedlichen Glomeruli und den damit verbundenen Neuronen. Die Karte ist anscheinend für unterschiedliche Individuen identisch.

Das Riechepithel und das Riechhirn haben allerdings eine wichtige Gemeinsamkeit: In beiden Zentren werden eingehende Signale unterschiedlicher Geruchsrezeptoren getrennt. Jede Riechzelle im Epithel und jeder Glomerulus mit seinen Relaisneuronen im Riechhirn scheint genau einem Rezeptortyp zugeordnet zu sein.

Der Aufbau dieser Karte ist mindestens in zweierlei Hinsicht wichtig. Erstens wird die Empfindlichkeit für niedrige Geruchsstoffkonzentrationen so wahrscheinlich maximiert. Die Signale von etwa 5000 Neuronen mit dem gleichen Rezeptor treffen in 2–4 Glomeruli und ungefähr 50 Mitralzellen zusammen, was ein hohes Maß an Signalintegration ermöglicht. Zweitens ist die Karte wahrscheinlich entscheidend für die Stimulierung im Gedächtnis gespeicherter Gerüche. Die Riechzellen im Epithel sind kurzlebig und

werden kontinuierlich ersetzt, während sich die Karte im Riechhirn nicht verändert. Der neuronale Code für einen Geruch bleibt also intakt. Damit ist sichergestellt, dass Geruchsstoffe schwache Erinnerungen wecken können.

6. Die Codierung von Gerüchen im Riechepithel und im Riechhirn

Da jeder Geruchsstoff anhand einer Rezeptorkombination erkannt wird,^[20] legen unsere Ergebnisse nahe, dass der Code für einen in der Nase wahrgenommenen Geruch aus einem Ensemble von Neuronen besteht, die jeweils eine Rezeptorkomponente des Geruchstoffcodes exprimieren (Abbildung 11). Im Riechhirn entspricht diesem Code eine

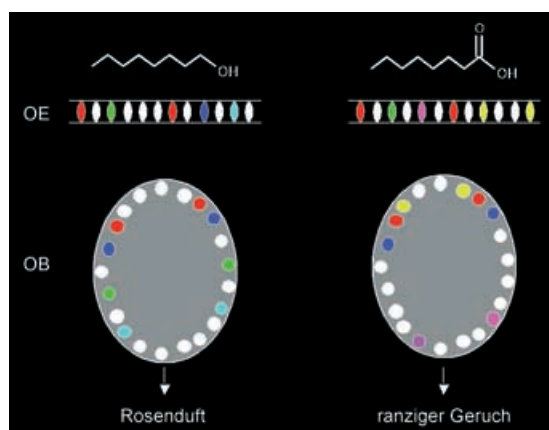


Abbildung 11. Codierung von Gerüchen in Riechepithel und Riechhirn. Signale unterschiedlicher Rezeptoren, die einen Geruchsstoff erkennen, sind durch unterschiedliche Farben dargestellt. Im Riechepithel (OE) ist der Code für einen Geruchsstoff ein verstreutes Ensemble von Neuronen, von denen jedes eine Komponente des Rezeptorcodes exprimiert. Im Riechhirn (OB) entspricht dem Code eine bestimmte Kombination von Glomeruli, deren räumliche Anordnung bei allen Versuchstieren ähnlich war. Partiiell überlappende Kombinationen eingehender Rezeptorsignale führen zu den jeweiligen Geruchsempfindungen.

bestimmte Kombination von Glomeruli, die die Signale dieser Rezeptoren empfangen und bei allen Individuen eine ähnliche räumliche Anordnung aufweisen. Die Existenz eines solchen geordneten Arrangements wird durch die Resultate zahlreicher Untersuchungen der geruchsinduzierten Aktivität in Epithel und Riechhirn gestützt: Bereits in den fünfziger Jahre hatte Lord Adrian entdeckt, dass jeweils andere Mitralzellen im Riechhirn von Hasen auf unterschiedliche Geruchsstoffgruppen reagieren.^[24–26]

7. Muster, Divergenz und Konvergenz in der Riechrinde

Wie entstehen aus Geruchsinformationen auf höheren Ebenen des Nervensystems letztlich unterschiedliche Geruchsempfindungen?

Axone von Mitralzell-Relaisneuronen im Riechhirn reichen bis in die Riechrinde, einen großen Bereich, der sich seitlich entlang der Unterseite des Gehirns erstreckt. Die Riechrinde setzt sich aus einer Reihe anatomischer Strukturen zusammen, die zumindest teilweise unterschiedliche Funktionen ausüben. Die größte Einheit ist der piriforme Cortex, dessen vordere und hintere Hälfte sich wiederum morphologisch voneinander abheben.

Lewis Haberly und andere platzierten in den achtziger Jahren Tracer in einem kleinen Teil der Riechrinde, die dann, entgegen der normalen Signalleitungsrichtung, Mitralzellen in vielen Teilen des Riechhirns markierten.^[27] Das Verteilungsmuster sensorischer Informationen in der Riechrinde unterscheidet sich also von dem im Riechhirn – worin genau, war zunächst aber unklar.

Wir stellten uns anfangs drei Fragen zur Riechrinde: Erhalten unterschiedliche Teile der Riechrinde, die unterschiedliche Funktionen haben könnten, Signale aus unterschiedlichen Teilsätzen von Geruchsrezeptoren, oder empfängt jeder Teil die Signale aller Rezeptoren? Werden die Signale eines Rezeptors in der Riechrinde verteilt (wie in der Nase), stets zu den gleichen Zentren weitergeleitet (wie im Riechhirn) oder in anderer Weise verarbeitet? Unter der Voraussetzung, dass jeder Geruchsstoff von mehreren Rezeptoren erkannt wird, war schließlich zu klären, ob die Signale unterschiedlicher Geruchsrezeptoren in individuellen Neuronen der Riechrinde gesammelt oder ob sie (wie in Nase und Riechhirn) auf unterschiedliche Neuronen aufgeteilt werden.

Um mehr über die Verteilung der Eingangssignale in der Riechrinde herauszufinden, untersuchte meine Studentin Lisa Horowitz zunächst, ob neuronale Schaltkreise genetisch identifiziert werden können. Dazu erzeugte sie transgene Mäuse, die ein Pflanzenprotein, Gerstenlektin (barley lectin, BL), in allen Riechzellen der Nase exprimierten. Die Expression dieses Lektins wurde durch den Promotor des OMP-Gens gesteuert, das selektiv durch Riechzellen exprimiert wird.

Mit BL-spezifischen Antikörpern wiesen wir das Gerstenlektin dann in Riechzellen im Riechepithel, in Glomeruli und Relaisneuronen im Riechhirn und auch in Neuronen in der Riechrinde nach.^[28] Offenbar kann das Lektin, das von Riechzellen in der Nase synthetisiert wird, zwei Synapsen überqueren und so in assoziierte Neuronen im Riechhirn und in der Riechrinde gelangen.

Nach der Entwicklung eines genetischen Verfahrens zur Kartierung neuronaler Schaltkreise untersuchten wir, wie eingehende Signale von Rezeptoren in der Riechrinde verarbeitet werden. Wir wollten Gerstenlektin mit nur einem der 1000 Geruchsrezeptorgene coexprimieren. Dazu modifizierten Lisa Horowitz und Jean-Pierre Montmayeur Rezeptorgene durch Insertion eines IRES (Internal Ribosome Entry Site)- und eines BL-codierenden Abschnitts in 3'-Stellung zu den codierenden Bereichen. Durch gezielte Veränderung von Genen (Gen-Targeting) in embryonalen Stammzellen erzeugte mein Postdoktorand Zhihua Zou „Knockin“-Mäuse, die ein verändertes Allel des M5- oder M50-Rezeptorgens enthielten.^[29] In diesen Knockin-Mäusen wird BL nur in Neuronen exprimiert, die auch das Rezeptorgen M5 oder M50 exprimieren.

In der Riechrinde verzweigen sich die Axone von Riechhirn-Neuronen und bilden in Schicht Ia Synapsen mit den Dendriten pyramidalen Neuronen in den Schichten II und III. In PompBL-Mäusen, die Gerstenlektin in allen Riechzellen exprimieren,^[28] wiesen wir markierte Neuronen in den Schichten II und III in der gesamten Riechrinde nach (Abbildung 12). Auch die M5- und M50-Knockin-Mäuse enthielten markierte Neuronen in der Riechrinde, diese befanden sich aber in klar abgegrenzten Clustern,^[29] die zudem in allen Individuen an ähnlichen Stellen zu sein schienen.

In jedem Stamm von Knockin-Mäusen wiesen wir 2–3 Cluster markierter Neuronen im vorderen piriformen Cortex nach (Abbildung 12). Die meisten dieser Cluster waren seitensymmetrisch in beiden Gehirnhälften lokalisiert. Auch in einigen anderen Bereichen der Riechrinde traten solche Cluster auf. In allen Clustern war die Dichte markierter Neuronen im Zentrum am höchsten, aber selbst dort war nur etwa die Hälfte der vorliegenden pyramidalen Neuronen mit dem BL-Tracer markiert.

Bei einer genauen Analyse der Cluster im vorderen piriformen Cortex stellten wir fest, dass sich ihre Lage und

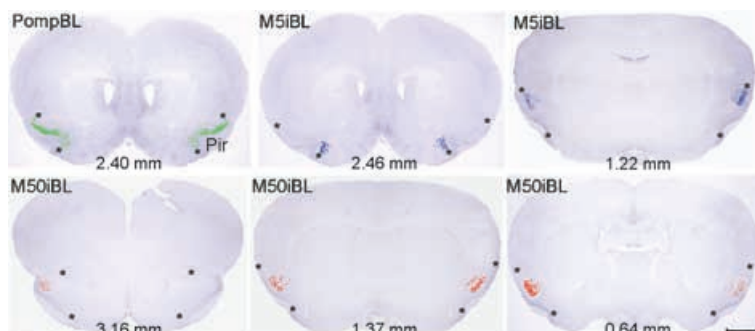


Abbildung 12. Eingehende Signale eines Rezeptortyps werden zu zwei bis drei Neuronenclustern in der Riechrinde weitergeleitet. Coronale Schnitte durch den vorderen piriformen Cortex von Mäusen, in denen Gerstenlektin in allen Riechzellen (PompBL) oder nur in den Neuronen exprimiert wird, die auch das Gen des M5- (M5iBL) oder M50-Geruchsrezeptors (M50iBL) exprimieren. Sterne deuten die Außengrenzen des piriformen Cortex (Pir) an. Der Abstand in mm von einem Bezugspunkt auf der Längsachse ist angegeben. Entnommen aus Lit. [29] und modifiziert.

Größe bei allen Individuen ähnelte und sie meist seitensymmetrisch angeordnet waren.^[29] Die Lage der Cluster war in den beiden Stämmen von Knockin-Mäusen unterschiedlich, einer der M5-Cluster schien aber teilweise mit einem der M50-Cluster zu überlappen.

Diesen Befunden zufolge gibt es in der Riechrinde eine Musterkarte eingehender Rezeptorsignale (Abbildung 13). Gemäß dieser Karte werden Signale eines Rezeptortyps an mehrere lockere Cluster von Neuronen der Riechrinde weitergeleitet. Cluster, die Signale von einem bestimmten Rezeptor empfangen, befinden sich bei allen Individuen an nahezu identischen Stellen.

Diese Aufteilung der Rezeptorsignale in der Riechrinde könnte eine parallele Verarbeitung ermöglichen, bei der

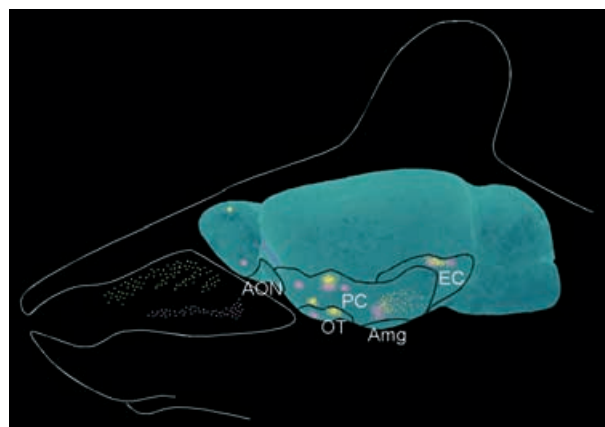


Abbildung 13. Musterkarte eingehender Rezeptorsignale in der Riechrinde. Verteilungsmuster eingehender Signale der M5- (gelb) und M50-Geruchsrezeptoren (rosa) in Riechepithel, Riechhirn und Riechrinde. Schwarze Linien kennzeichnen unterschiedliche Areale in der Riechrinde. AON: vorderer olfaktorischer Kern; PC: piriformer Cortex; OT: olfaktorischer Tuberkel; Amg: olfaktorischer Kern der Amygdala (Mandelkern); EC: seitlicher entorhinaler Cortex.

Signale der gleichen Rezeptoren in unterschiedlicher Weise miteinander kombiniert oder moduliert werden, bevor sie an andere Gehirnregionen weitergeleitet werden.

Die Neuronencluster im vorderen piriformen Cortex, die Signale eines Rezeptors empfangen, belegen etwa fünf Prozent der Gesamtfläche entlang der Längs- und der Dorsal-ventral-Achse.^[29] In PompBL-Mäusen, die Gerstenlektin in allen Riechzellen exprimieren, wiesen wir etwa 180 000 BL-markierte Neuronen im vorderen piriformen Cortex nach. Würde jedes Neuron der Riechrinde Signale von nur einem von 1000 unterschiedlichen Geruchsrezeptoren empfangen, so wären in diesem Bereich bei Knockin-Mäusen etwa 180 markierte Neuronen zu erwarten. Wir wiesen für jeden Stamm von Knockin-Mäusen allerdings etwa 4000–6000 BL-markierte Neuronen im vorderen piriformen Cortex nach.^[29]

Diese Befunde lassen auf deutliche Unterschiede zwischen der Karte eingehender Rezeptorsignale in der Riechrinde und dem Riechhirn schließen. Im Riechhirn werden Signale unterschiedlicher Rezeptoren auf die Glomeruli aufgeteilt und somit räumlich getrennt, in der Riechrinde überlappen sie dagegen wahrscheinlich stark (Abbildung 14 A). Außerdem empfängt jedes Neuron der Riechrinde wahrscheinlich Signale von mehreren unterschiedlichen Rezeptoren, während diese in Nase und Riechhirn ja auf mehrere Neuronen verteilt werden (Abbildung 14 B). Weil jeder Geruchsstoff anhand einer Rezeptorkombination erkannt wird, könnte dies eine erste Integration mehrerer Komponenten des Rezeptorcodes ermöglichen, die für die Entstehung einer Geruchsempfindung entscheidend ist.

Demnach könnte man die Neuronen in der Riechrinde als Koinzidenzdetektoren betrachten, die nur durch einen korrelierten, kombinatorischen Eingang von Signalen unter-

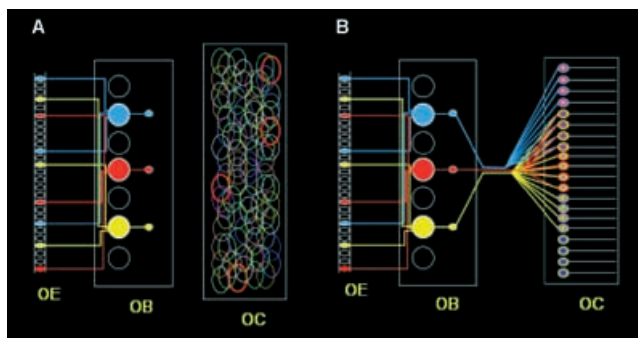


Abbildung 14. Signalverteilungsmuster von Geruchsrezeptoren in Riechepithel (OE), Riechhirn (OB) und Riechrinde (OC). Eingehende Signale unterschiedlicher Rezeptoren werden im Epithel und im Riechhirn auf unterschiedliche Neuronen und Glomeruli aufgeteilt. In der Riechrinde scheinen die Signale unterschiedlicher Rezeptoren dagegen stark zu überlappen (A); einzelne Neuronen der Rinde scheinen Signale einer Kombination von Rezeptoren zu empfangen (B).

schiedlicher Geruchsrezeptoren aktiviert werden. Ein einfaches Modell könnte so aussehen: Die Signale unterschiedlicher Rezeptoren, die Vanillin erkennen, werden zu teilweise miteinander überlappenden Stellen in der Rinde weitergeleitet, es werden aber nur solche Neuronen durch Vanillin aktiviert, die gleichzeitig Signale mehrerer Vanillin-Rezeptoren erhalten.

Bei Sinneswahrnehmungen werden Reize aus der Umwelt analysiert und dann im Gehirn wieder zusammengesetzt, um eine Empfindung zu erzeugen. Die Verarbeitung der Rezeptorsignale in der Riechrinde könnte der erste Schritt bei der Rekonstruktion eines „Geruchsbilds“ aus seinen Fragmenten sein.

Ich danke meinen talentierten Studenten und Postdoktoranden, die die hier beschriebenen Experimente ausführten. Kerry Ressler und Susan Sullivan machten all die frühen Untersuchungen über Geruchsrezeptorsignale in Riechepithel und Riechhirn. Hiroaki Matsunami identifizierte und charakterisierte die V2R-Familie der Pheromonrezeptor-Kandidaten. Bettina Malnic bearbeitete zusammen mit Takaaki Sato und Junzo Hirono vom Life Electronic Research Center in Japan die Spezifität der Geruchsrezeptoren. Bettina und Paul Godfrey definierten das Repertoire der Geruchsrezeptorgene von Menschen und Mäusen. Lisa Horowitz entwickelte das genetische Verfahren zum Aufspüren neuronaler Schaltkreise, und Zhihua Zou untersuchte in Zusammenarbeit mit Lisa und Jean-Pierre Montmayeur die Verarbeitung der Rezeptorsignale in der Riechrinde.

Eingegangen am 30. März 2005

Übersetzt von Dr. Jürgen Eckwert, Seeheim-Jugenheim

- [1] „Chemical transmission in the nose of the frog“: R. C. Gesteland, J. Y. Lettvin, W. H. Pitts, *J. Physiol.* **1965**, *181*, 525–559.
- [2] J. E. Amoore, *Molecular Basis of Odor*, Charles C. Thomas, Springfield, **1970**.
- [3] „Specific anosmia and the concept of primary odors“: J. E. Amoore, *Chem. Senses Flavour* **1977**, *2*, 267–281.
- [4] „Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception“: U. Pace, E. Hanski, Y. Salomon, D. Lancet, *Nature* **1985**, *316*, 255–258.
- [5] „The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants“: P. B. Sklar, R. R. Anholt, S. H. Snyder, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15538–15543.
- [6] „Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction“: D. T. Jones, R. R. Reed, *Science* **1989**, *244*, 790–795.
- [7] „A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition“: L. Buck, R. Axel, *Cell* **1991**, *65*, 175–187.
- [8] „Molecular biology of odorant receptors in vertebrates“: P. Mombaerts, *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 487–509.
- [9] „The complete human olfactory subgenome“: G. Glusman, I. Yanai, I. Rubin, D. Lancet, *Genome Res.* **2001**, *11*, 685–702.
- [10] „The human olfactory receptor repertoire“: S. Zozulya, F. Echeverri, T. Nguyen, *Adv. Genome Biol.* **2001**, *2*, RESEARCH0018.
- [11] „Different evolutionary processes shaped the mouse and human olfactory receptor gene families“: J. M. Young, C. Friedman, E. M. Williams, J. A. Ross, L. Priddy-Tonnes, B. J. Trask, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 535–546.
- [12] „The olfactory receptor gene superfamily of the mouse“: X. Zhang, S. Firestein, *Nat. Neurosci.* **2002**, *5*, 124–133.
- [13] „The mouse olfactory receptor gene family“: P. A. Godfrey, B. Malnic, L. B. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2156–2161.
- [14] „The human olfactory receptor gene family“: B. Malnic, P. A. Godfrey, L. B. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 2584–2589.
- [15] a) „A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals“: C. Dulac, R. Axel, *Cell* **1995**, *83*, 195–206; b) „A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution“: G. Herrada, C. Dulac, *Cell* **1997**, *90*, 763–773.
- [16] „A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals“: H. Matsunami, L. B. Buck, *Cell* **1997**, *90*, 775–784.
- [17] „A new multigene family of putative pheromone receptors“: N. J. Ryba, R. Tirindelli, *Neuron* **1997**, *19*, 371–379.
- [18] „A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium“: K. J. Ressler, S. L. Sullivan, L. B. Buck, *Cell* **1993**, *73*, 597–609.
- [19] „Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium“: R. Vassar, J. Ngai, R. Axel, *Cell* **1993**, *74*, 309–318.
- [20] „Combinatorial receptor codes for odors“: B. Malnic, J. Hirono, T. Sato, L. B. Buck, *Cell* **1999**, *96*, 713–723.
- [21] „Functional expression of a mammalian odorant receptor“: H. Zhao, L. Ivic, J. M. Otaki, M. Hashimoto, K. Mikoshiba, S. Firestein, *Science* **1998**, *279*, 237–242.
- [22] „Information coding in the olfactory system: evidence for a stereotyped and highly organized epitope map in the olfactory bulb“: K. J. Ressler, S. L. Sullivan, L. B. Buck, *Cell* **1994**, *79*, 1245–1255.
- [23] „Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb“: R. Vassar, S. K. Chao, R. Sitcheran, J. M. Nunez, L. B. Vosshall, R. Axel, *Cell* **1994**, *79*, 981–991.

- [24] „Sensory discrimination with some recent evidence from the olfactory organ“: E. D. Adrian, *Br. Med. Bull.* **1950**, 6, 330–333.
 - [25] „The action of the mammalian olfactory organ“: L. Adrian, *J. Laryngol. Otol.* **1956**, 70, 1–14.
 - [26] „Information coding in the vertebrate olfactory system“: L. B. Buck, *Annu. Rev. Neurosci.* **1996**, 19, 517–544.
 - [27] „The olfactory cortex“: L. B. Haberly in *The Synaptic Organization of the Brain* (Hrsg.: G. M. Shepherd), Oxford University Press, New York, **1998**, S. 377–416.
 - [28] „A genetic approach to trace neural circuits“: L. F. Horowitz, J. P. Montmayeur, Y. Echelard, L. B. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 3194–3199.
 - [29] „Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex“: Z. Zou, L. F. Horowitz, J. P. Montmayeur, S. Snapper, L. B. Buck, *Nature* **2001**, 414, 173–179.
 - [30] „The chromosomal distribution of mouse odorant receptor genes“: S. L. Sullivan, M. A. Adamson, K. J. Ressler, C. A. Kozak, L. B. Buck, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 884–888.
-