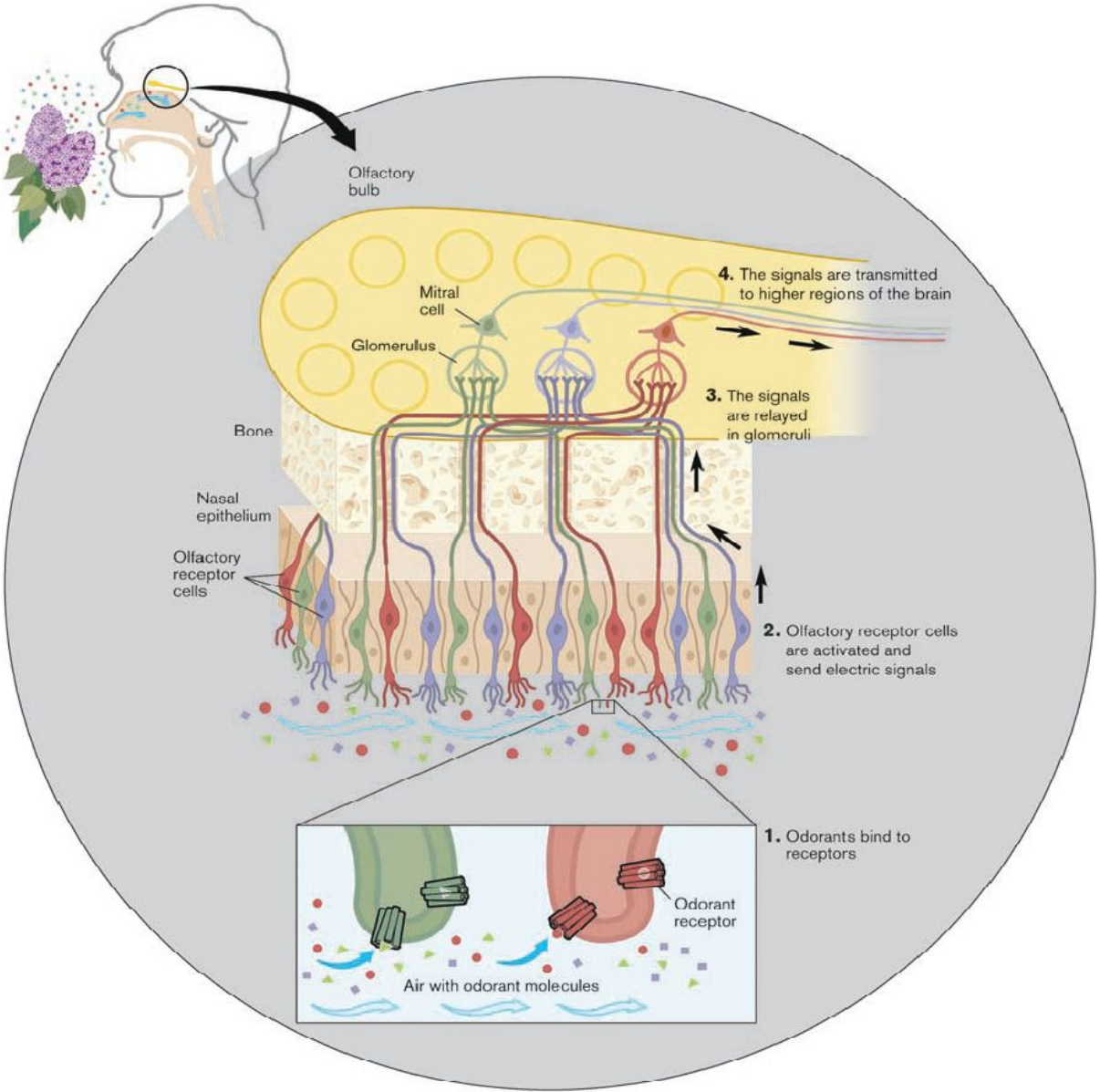
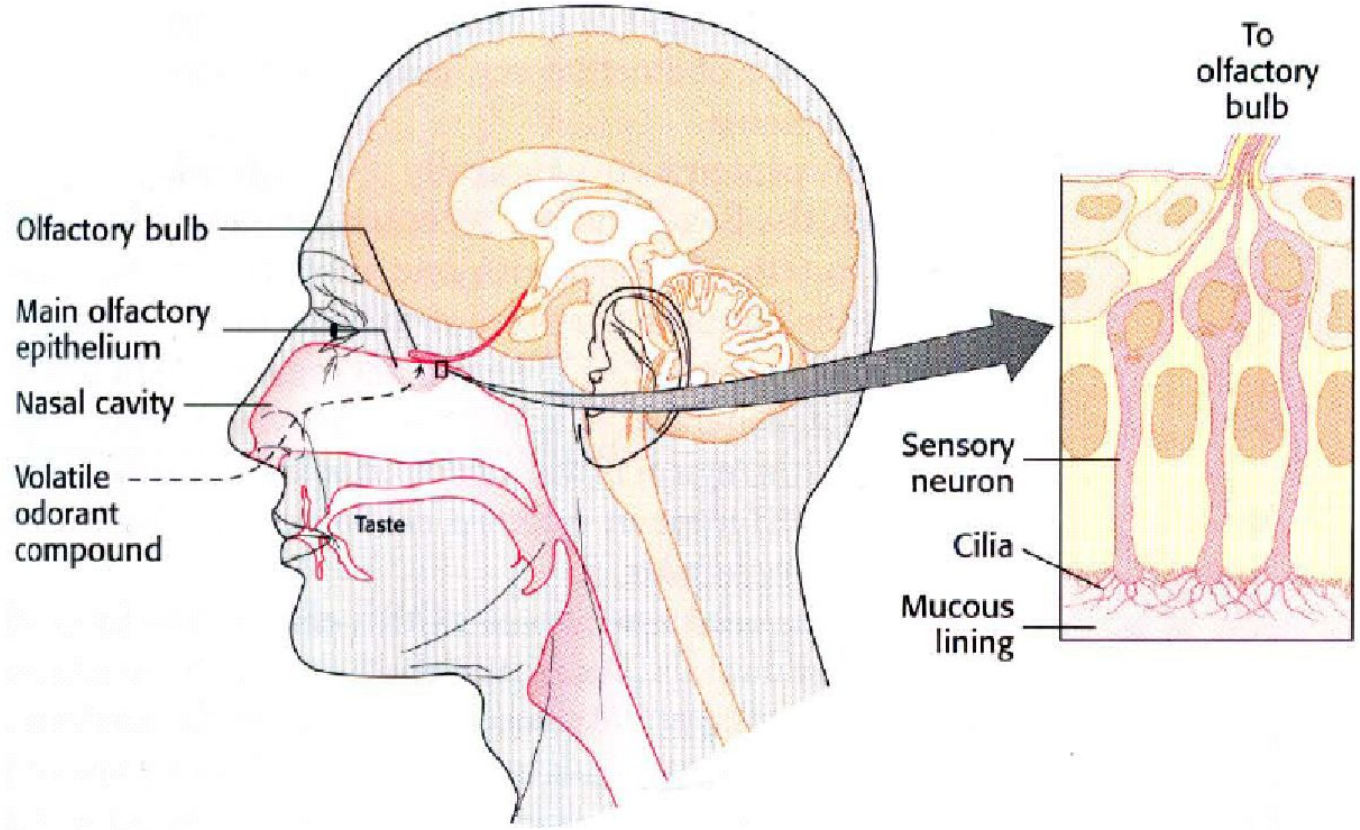
Odorant Receptors and the Organization of the Olfactory System

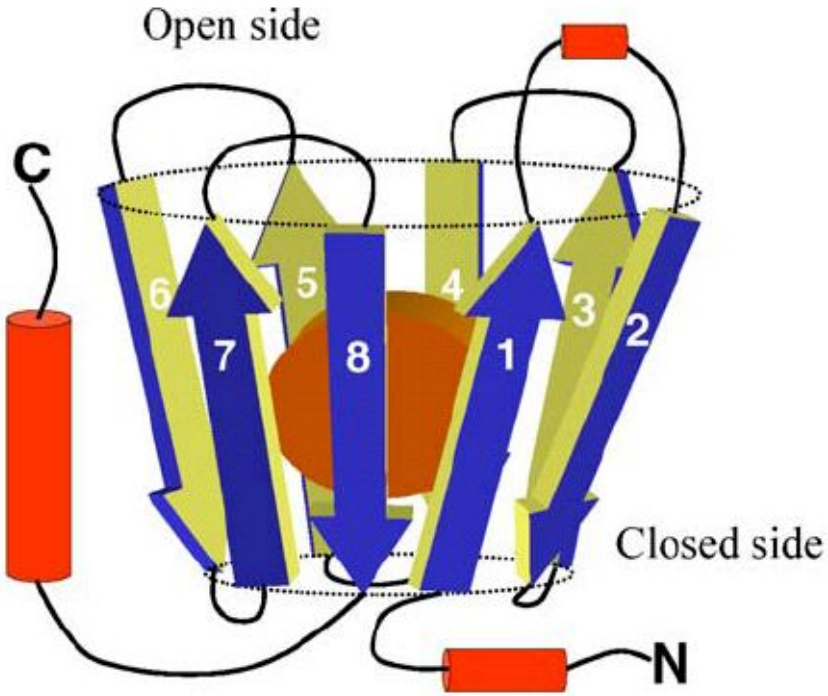


Обонятельная рецепция

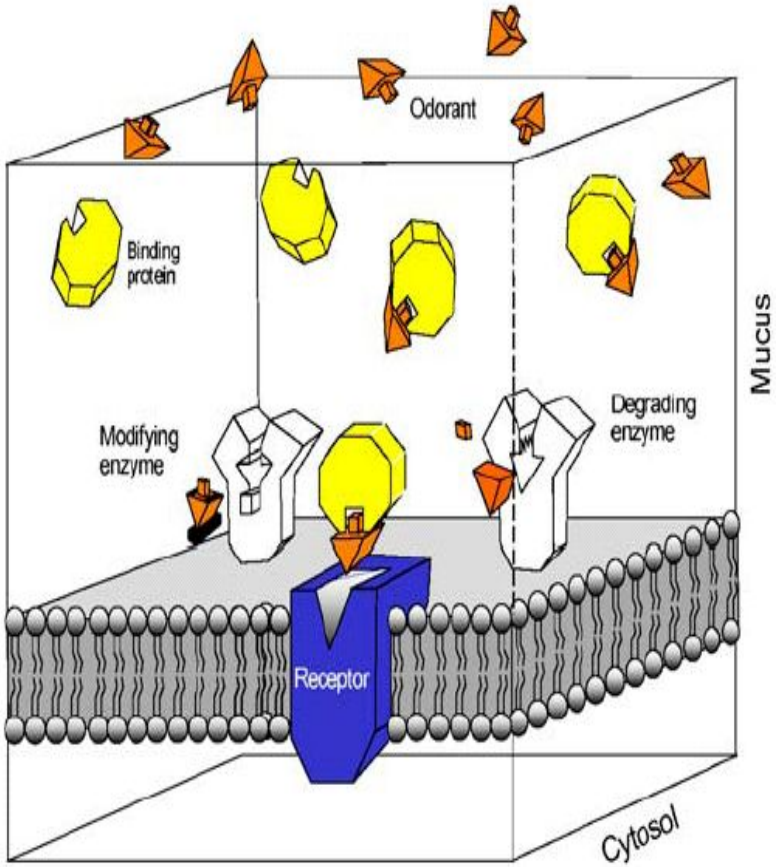


Назальный эпителий.Область носа, которая лежит выше назальной полости, содержит около миллиона сенсорных нейронов. Нервные импульсы, возникающие при связывании молекул одоранта рецепторами в ресничках, передаются по сенсорным нейронам в обонятельную луковицу

Odorant binding proteins (OBP)



В мукусной жидкости, окружающей сенсорные дендриты и реснички обнаружены небольшие водорастворимые белки. Они продуцируются гландами назальной полости. Эти белки по-видимому связывают гидрофобные одоранты и увеличивают их доступ к рецепторам. Они представляют собой полипептидные цепи, свернутые в 8 β-листов с α- спиральным доменом вблизи С- конца цепи. β-листы образуют связанную Н-связями бочкообразную β-структуру, во внутреннюю полость которой включаются гидрофобные лиганды.



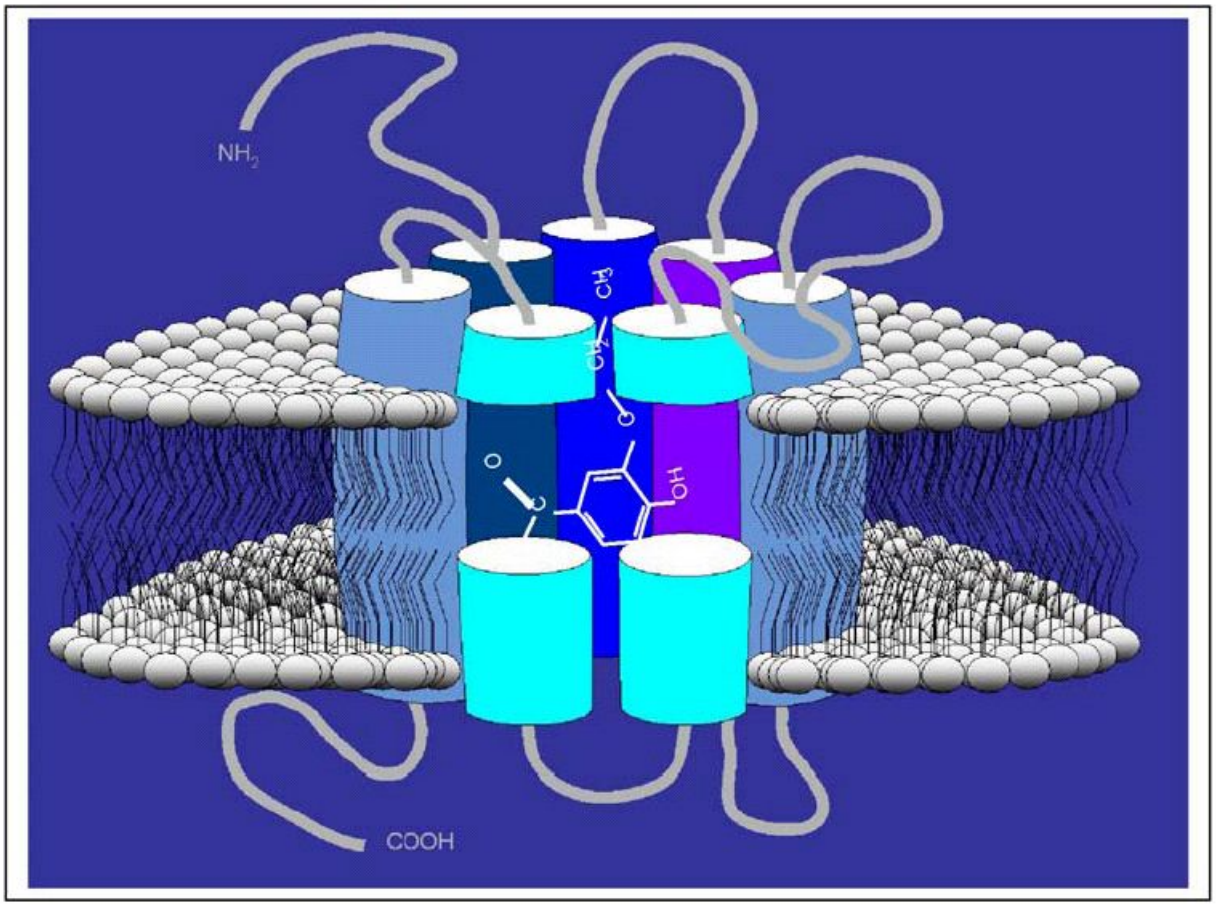
Функция обоняния в основном состоит в мониторинге химического окружения путем вдыхания и выдыхания через нос. Поэтому важно, чтобы одоранты, полученные при вдыхании, быстро исчезали, чтобы дать место следующей волне одорантов. Т.о. необходимы быстрая инактивация или удаление одорантов для непрерывного приема новых сигналов. Одоранты, по-видимому, инактивируются с помощью ферментов биотрансформации или интоксикации

ОВР обеспечивают вход, выход и время пребывания одорантов вблизи рецепторов и действуют как переносчики одорантов через муксусный слой.

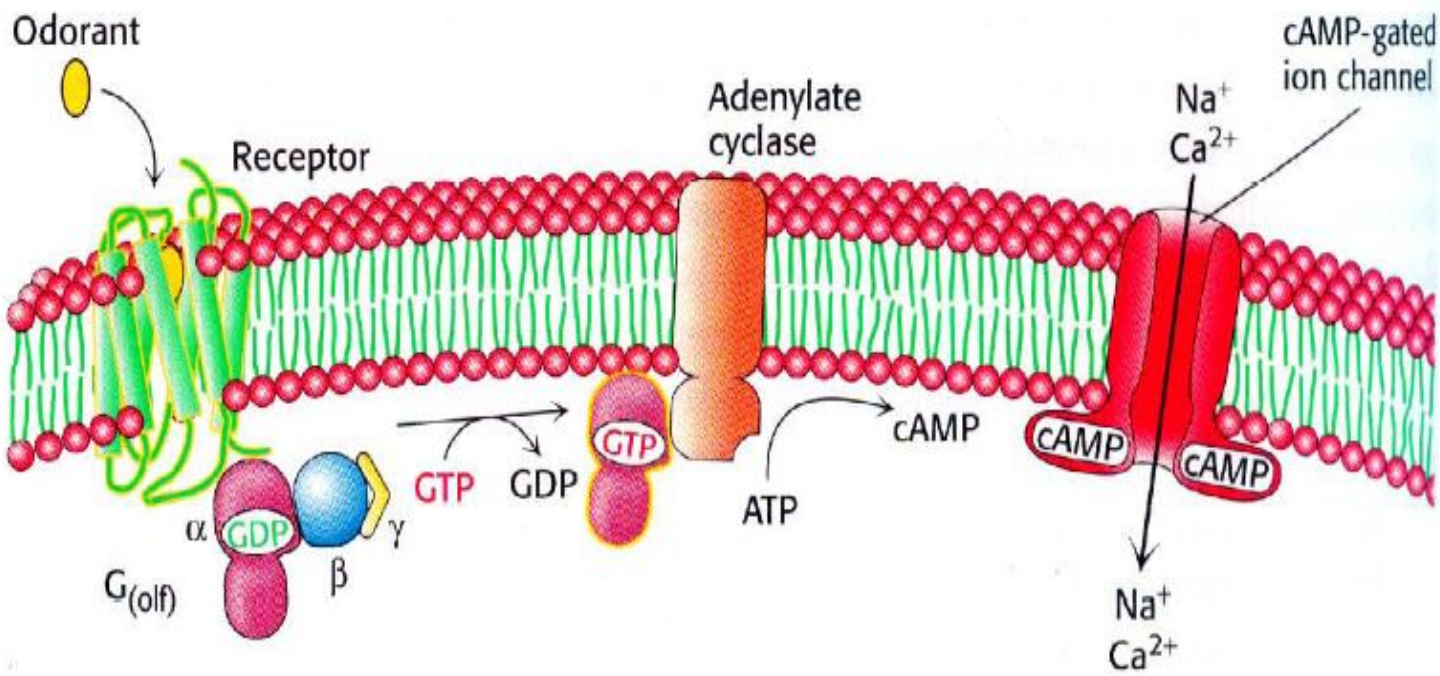
Обоняние обеспечивается за счет громадного семейства рецепторов, которые представляют собой трансмембранные белки, состоящие из семи α-спиралей, пронизывающих плазматическую липидную мембрану

Одоранты детектируются в специфической области носа –обонятельном эпителии который находится в верхней части назальной полости (см. рис.)

Примерно 1 миллион сенсорных нейронов подходят к границе этой области. Волоски (cilia), содержащие белковые рецепторы одорантов, отходят от этих нейронов в мукусное пространство назальной полости.
В биохимических исследованиях, проведенных в 80х годах 20 в, исследовали изолированные cilia из эпителия крысы. Под действием одорантов было обнаружено увеличение внутриклеточного медиатора ц-АМФ в клетках, которое наблюдалось только в присутствии ГТФ. На основании того, что было уже известно о системах передачи (трансдукции) внешних сигналов в клетки, участие ц-АМФ и ГТФ свидетельствовало об участии G-белков и следовательно 7-ТМ рецепторов. Участие этих рецепторов определило стратегию идентификации самих рецепторов. Были проведены поиски дополнительных ДНК, которые (1) экспрессировались в сенсорных нейронах , подходящих к назальному эпителию (2) кодировали, 7ТМ белки и (3) присутствовали в виде большого и разноообразного семейства, соответствующего широкому набору одорантов. По этим критериям ДНК, ответственные за рецепторы одорантов, были в 1991 году идентифицированы Рихардом Акселем и Линдой Бак (нобелевская премия 2003 г.)



topology of an odorant receptor. The seven transmembrane domains (TMD) are supposed to form a „funnel“ which accommodates the odorous ligands. The specificity of the binding site is determined by amino acid side-chains of the central TMD



Связывание одоранта с ОР на нейрональной поверхности инициирует каскад трансдукции сигнала, который приводит к созданию потенциала действия.Связанный с лигандом ОР активирует белок Golf,, который исходно связан с GDP.При активации освобождается GDP, связывается GTP и освобождаются субъединицы βγ . Субъединица α активирует фермент аденилатциклазу, которая увеличивает концентрацию cAMP. Рост cAMP активирует катионные каналы, через которые Са и другие катионы входят в клетку, деполяризуя нейрональную мембрану и инициируя потенциал действия. Этот потенциал вместе с потенциалами действия от других обонятельных нейронов приводит к восприятию запаха.

Ощущение запаха: молекулярные основы узнавания одоранта

MECHANISMS INVOLVED IN ODORANT RECOGNITION

(1) The 'profile-functional group' theory of olfaction

1. Действие химических функциональных групп

Давно замечено, что присутствие определенных химических групп часто Коррелирует с определенным запахом. Известный пример - группа SH, которая придает любой молекуле, независимо от ее формы специфический запах гнилых яиц или чеснока. Другие Химические группы также придают специфические запахи, которые может обнаружить опытный наблюдатель. Так, нитрилы (CN) придают «масло- металлический» оттенок запаха любому одоранту.

Обонятельная рецепция основана на активации молекулами одоранта обонятельных рецепторов (ОР), расположенных на ресничках обонятельных нейронных окончаний. Со времени открытия генов ОР (Бак и Аксель, 1991) был достигнут большой прогресс в понимании физиологических и биохимических основ обоняния, но механизмы рецепции на молекулярном уровне мало понятны.

Колебательная теория обоняния

Спектральные исследования Дайсона в 1930г. обнаружили корреляцию между запахом и колебательными частотами молекул. На основании Этих результатов было предположено, что органы Обоняния могут каким-то образом детектировать Молекулярные колебания и определенные запахи были Отнесены к рамановским частотами в интервале 1500-300 см(-1). Эта теория была подвергнута ревизии Райтом (1954 г.), который отметил, что рамановские линии в этом интервале хорошо коррелируют с конкретными Функциональными группами (OH, SH, CO etc.)одоранта. Если запах может коррелировать с этими частотами, он может также коррелировать с соответствующими Функциональными группами и ,следовательно, нет нужды в колебательной теории запаха.

2.1. Теория обоняния за счет **profile-functional groups**.

Химики давно заметили, что присутствие в молекуле определенных химических групп часто коррелирует с определенным запахом. Наиболее известный пример - группа SH, которая придает любой молекуле независимо от ее формы уникальный «серный» запах , похожий на запах тухлых яиц или чеснока. Исследования корреляции между структурой и запахом дали лучшее понимание запаха S- соединений. Другие химические группы также придают определенный запах, который может быть обнаружен тренированными наблюдателями. Так, нитрилы придают «масляно-металлический» запах любому одоранту; изонитрилы ( ) - плоский металлический характер большой мощности неприятного ощущения; оксимы - зеленовато-камфорный характер, нитрогруппы ( ) приятно эфирный запах, изотиоцианатные группы дают mustardy запах,аминогруппы - запах рыбы и мочи, арсиновая группа -запах капусты, а сложно-эфирная группа – обычно пахнет фруктами.

Наличие «собственного запаха» функциональной группы особенно очевидно в небольших молекулах, поскольку присутствие больших алкильных и фенильных групп может мешать взаимодействию функциональных групп и приводить к другому запаху ( ).

Корреляция между функциональной группой и характером запаха привела еще в 1920 г. к идее, что именно функциональная группа определяет качество запаха, в то время как общая структура молекулы оказывает лишь вторичное влияние. Битс предложил в 1957 г. т.н. теорию обоняния за счет **profile-functional groups** : запах определяется двумя вкладами : (1) от формы, размера и объемных очертаний молекулы и (2) функциональной группой (группами),которые определяют ориентацию молекулы в рецепторном центре. Эффективность функциональной группы, т.е. ее способность эффективно ориентировать одорант в рецепторном сайте, по крайней мере, частично определяется ее тенденцией к образованию водородных связей.

2.2. **Вибрационная теория обоняния**.

Спектроскопические исследования Дайсона в 1930 г. обнаружили корреляцию между определенными запахами и колебательными частотами молекул (1938). Согласно этим результатам обонятельные органы могут каким-то образом обнаруживать молекулярные колебания и определенные запахи были приписаны определенным рамановским частотам в диапазоне 1500-3000 см-1. Эта теория была вновь рассмотрена Райтом (1954), который указал, что в этой области рамановские линии сильно коррелируют с определенными функциональными группами (OH, SH, CO etc.). Если запахи коррелируют с этими частотами, они также могут коррелировать с соответствующими функциональными группами и следовательно, нет нужды в колебательной теории запаха. Таким образом, для того, чтобы подкрепить эту теорию, нужно искать корреляцию между запахом, спектром молекулярных колебаний на частотах ниже примерно 700 см-1.

Несмотря на значительные усилия подтвердить колебательную теорию запаха, лишь ограниченный успех был достигнут в поисках корреляции между характером запаха и низкочастотными молекулярными колебаниями. Эта теория совершенно не может объяснить, почему различные энантиомеры, имеющие идентичный колебательный спектр, производят различные запахи . Более того, не был найден биологический механизм, который молекулярные колебания переводит в активацию нейронов.

(3) The steric theory of olfaction

After the discovery of enzyme-substrate interactions based on molecular recognition between a protein receptor and a ligand, scientists suggested that a similar mechanism could be involved in olfaction. So, molecules with a particular shape would fit into certain complementary sites of nasal receptors, like a key into a lock, triggering a signal processed by the brain (Moncrieff, 1949). This 'steric theory' proposed by Moncrieff was later referred to as 'stereochemical theory' by Amoore (1963), who popularized the idea that molecular shape is related to odour character, a concept widely accepted today. He compared the odour description and molecular structure of a large number of compounds and found some similarity between odour and molecular shape. Accordingly, he suggested that different smells such as ethereal, floral, pepperminty, camphoraceous and musky odours were conferred by molecules sharing distinctive structural features. Camphoraceous is the term used to describe the smell of molecules like d-camphor, hexachloroethane or 1,8-cineole, that have a spherical shape (Amoore, 1963). Given this clear relationship between shape and odour, it was assumed that there was an olfactory receptor that recognized molecules with this particular shape, and consequently camphoraceous was considered as a primary odour.

2.3. Стерическая теория обоняния.

После открытия фермент-субстратных взаимодействий, основанных на молекулярном узнавании между белковым рецептором и лигандом, было предположено, что аналогичный механизм действует при обонятельной рецепции. Так, молекулы определенной формы включаются в определенные комплиментарные сайты носовых рецепторов, как ключ в замок, приводя к возникновению сигнала, который анализируется мозгом. Эта стерическая теория, предложенная Монкрифом (1949), стала позже называться стереохимической теорией после работ Амора (1963), который популяризировал идею, что форма молекулы связана с характером запаха- концепция, которая в настоящее время широко распространена.

В 1991 Бак и Аксель обнаружили исключительно большое мультигенное семейство трансмембранных белков, которых отнесли к обонятельным рецепторам, поскольку их экспрессия была ограничена обонятельным эпителием крыс. Большое число этих рецепторов позволяло понять, как можно было различать большое число одорантов. Эти белки относятся к типу связанных с G-белками рецепторов, которые охватывают большое число рецепторов, реагирующих на самые различные стимулы. АК последовательность этих белков содержит 7 сегментов с гидрофобными АК, которые как предсказывается, способны образовывать альфа –спиральные структуры, погруженные внутрь мембраны.Эти альфа-спиральные участки чередуются с сегментами гидрофильных АК, которые образуют петли, которые устойчивы в водной среде и связывают между собой альфа-спирали.(Рис. 1.)

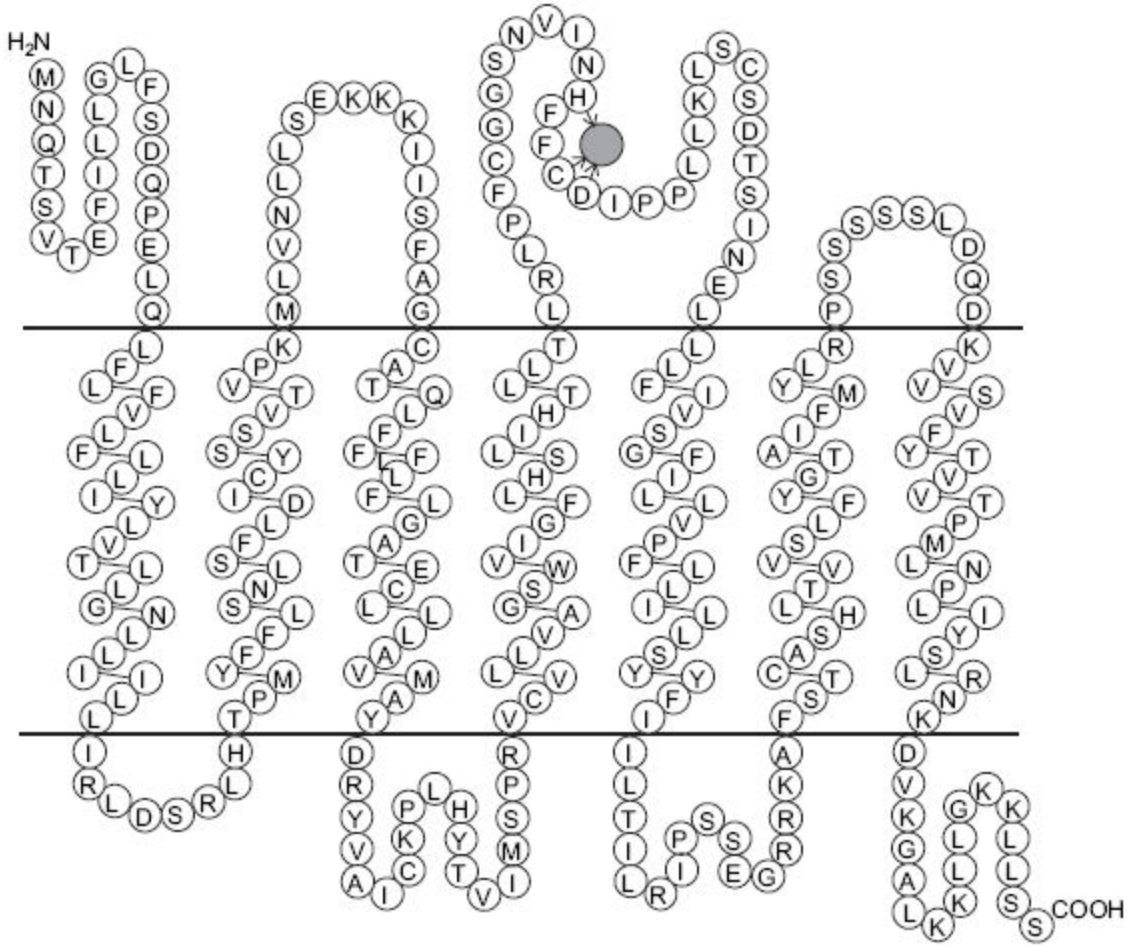
Последовательности в 3,4 и 5 α-спиралях сильно изменчивы для различных изоформ; Поэтому было предположено, что эти области участвуют в образовании центров связывания различных одорантов.Семь α-спиралей образуют связку, которая содержит место связывания на внешней стороне мембраны и место связывания на ее цитоплазматической стороне, которая связывает гетеро-тримерный G-белок

III. DISCOVERY AND CHARACTERIZATION OF OLFACTORY RECEPTORS

(1) The discovery of olfactory receptors

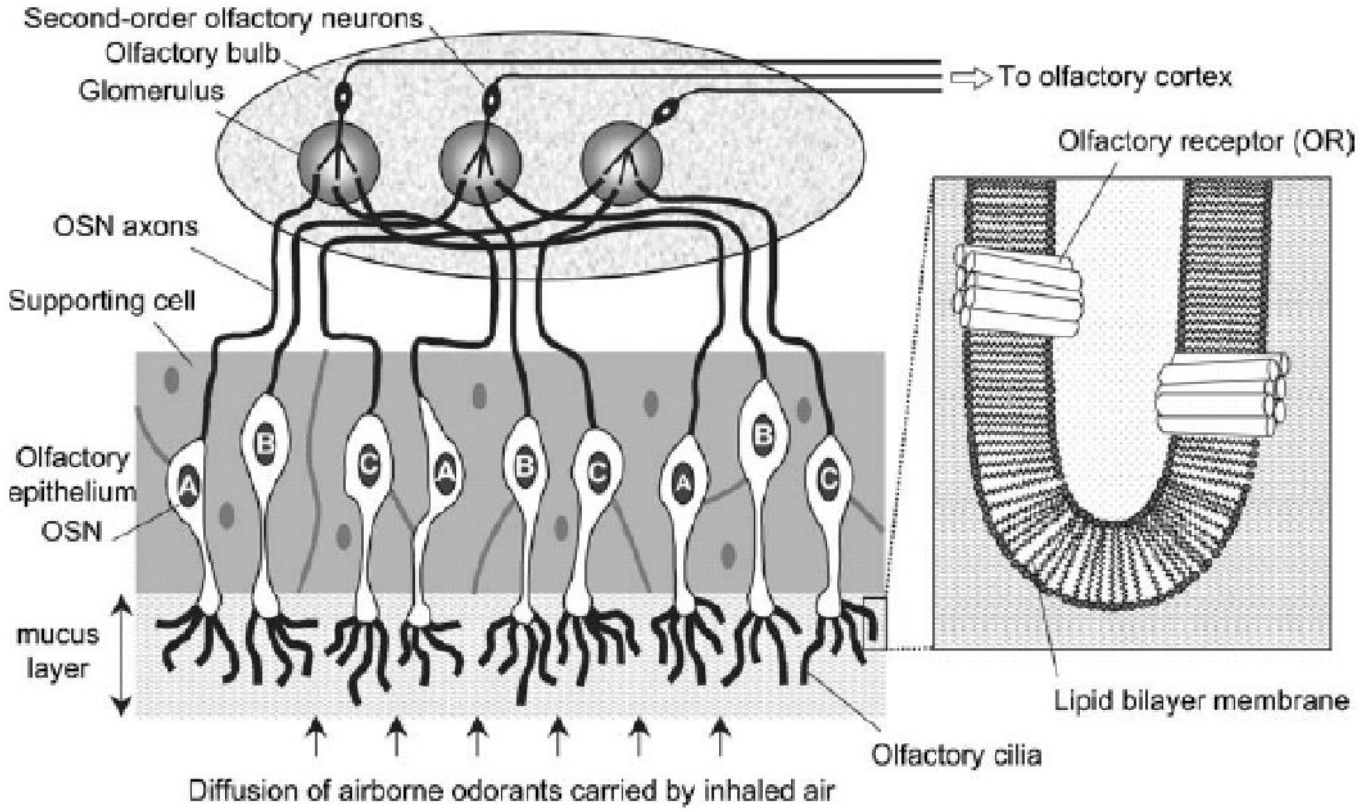
In 1991 Buck and Axel discovered an extremely large multigene family of transmembrane proteins that were believed to be ORs, since their expression was restricted to the rat olfactory epithelium (Buck & Axel, 1991). The numerous variants of the receptors suggested how a large number of different odorants may be discriminated. These proteins belong to the well-known family of G-protein-coupled receptors (GPCRs), that comprises a variety of receptors for a multitude of different stimuli. Their sequence contains seven segments with mostly hydrophobic amino acid residues, that are predicted to form α-helix structures buried in the lipid bilayer membrane, alternated with segments of hydrophilic residues that form loops which are stable in the water domain, interconnecting the helices (Fig. 1). The sequence in the 3rd, 4th and 5th transmembrane (TM) domains is highly variable between the different isoforms of this gene, and thus it was suggested that they would be involved in the odorant binding site (Buck & Axel, 1991; Pilpel & Lancet, 1999; Liu *et al.*, 2003). The seven TM helices pack against each other to form a bundle assembly (Fig. 1) that contains an odorant binding site on the extracellular side (corresponding to the mucus layer in the nose) and a binding site on the cytoplasmic domain that couples a heterotrimeric G-protein (guanine nucleotide binding protein), that is made up of three subunits.

Richard Axel



Consensus amino acid sequence of class II olfactory receptors showing the predicted transmembrane (TM) regions

Most residues in the TM regions are hydrophobic (leucine, L; isoleucine, I; valine, V; phenylalanine, F; alanine, A; tryptophan, W), while the most hydrophilic residues are usually located in the water domain (arginine, R; lysine, K; aspartic acid, D; glutamic acid, E). The loop between TM4 and TM5 contains the HFFCD consensus motif, that might coordinate a metal ion (filled circle) (Wang *et al.*, 2003). By contrast, other authors suggest that the cysteine (C) of this motif may form a disulphide bond with other cysteine residues (Zozulya, Echeverri & Nguyen, 2001; Liu *et al.*, 2003).



Organization of the mammalian olfactory system.

The first functional proof that one OR gene encodes a receptor selectively activated by an odorant was provided by Zhao *et al.* (1998), who used a recombinant adenovirus to drive the expression of a particular OR gene in the rat olfactory epithelium. Records of electrical activity in the neurons showed that increased expression of a single gene led to a greater sensitivity to a small group of odorants (Zhao *et al.*, 1998).

olfactory sensory neuron (OSN) expresses only one member of the OR gene family in the mouse olfactory system (Ressler, Sullivan & Buck, 1994). The mechanisms involved in this 'one neuron – one OR' rule have been investigated.

Functional ORs are likely to initiate a feedback signal in order to ensure that no other OR gene will be expressed in

The axons of OSNs expressing the same OR converge to only one or a few of some 2000 modules, called glomeruli

(2) **Olfactory receptor specificity**

(3) **Attempts to identify key amino acid residues in olfactory receptors**

(4) Structural changes in the receptor upon odorant binding

Details of the conformational changes upon odorant binding are unknown, but a mechanism similar to other GPCRs is usually assumed. Different studies have revealed that photoactivation of rhodopsin involves a rotation and tilting of TM6 with respect to TM3 (Lin & Sakmar, 1996). The β_2-adrenergic receptor was suggested upon agonist activation to undergo a conformational change similar to that seen in rhodopsin (Ghanouni *et al.*, 2001), that in this case may involve disruption of a strong ionic interaction between TM3 and TM6 (Ballesteros *et al.*, 2001). A similar mechanism was proposed for serotonin receptors (Shapiro *et al.*, 2002). The loop between TM3 and TM4 (cytoplasmic domain) contains a DRY motif (single-letter amino acid notation: aspartic acid – arginine – tyrosine) that is conserved in ORs and other GPCRs with slight variations ([DE][RH][YF]). Studies involving site-directed mutagenesis of this motif in the H(2) receptor (Alewijnse *et al.*, 2000), the α_{1b}-adrenergic receptor (Scheer *et al.*, 2000) and the AT_{1A} angiotensin receptor (Gáborik *et al.*, 2003) have revealed that it plays a pivotal role in the activation process of GPCRs. Although the details of G-protein activation are not yet clear, it seems that the relative movement of TM helices upon ligand binding exposes the DRY motif to the intracellular domain, and allows the coupling of the specific subtype of G-protein.

IV. THE THEORY OF OLFACTORY RECEPTORS AS METALLOPROTEINS

Although the odotope theory is currently the most widely accepted, the largely divergent and characteristic odours of small molecules such as NH_3, H_2S or HCN cannot easily be explained by differences in nucleophilic or electrophilic character. The fact that alcohols (–OH) never smell like thiols (–SH) at any concentration, despite the similar shape and properties of both functional groups, suggests that the recognition mechanism must somehow be sensitive to the fine structure of the electron distribution (orbital energies, charge density, *etc.*) of the functional group (Turin & Yoshii, 2003), an aspect not properly taken into account by the odotope theory.

(1) The mechanism of odorant recognition based on Inelastic Electron Tunneling Spectroscopy

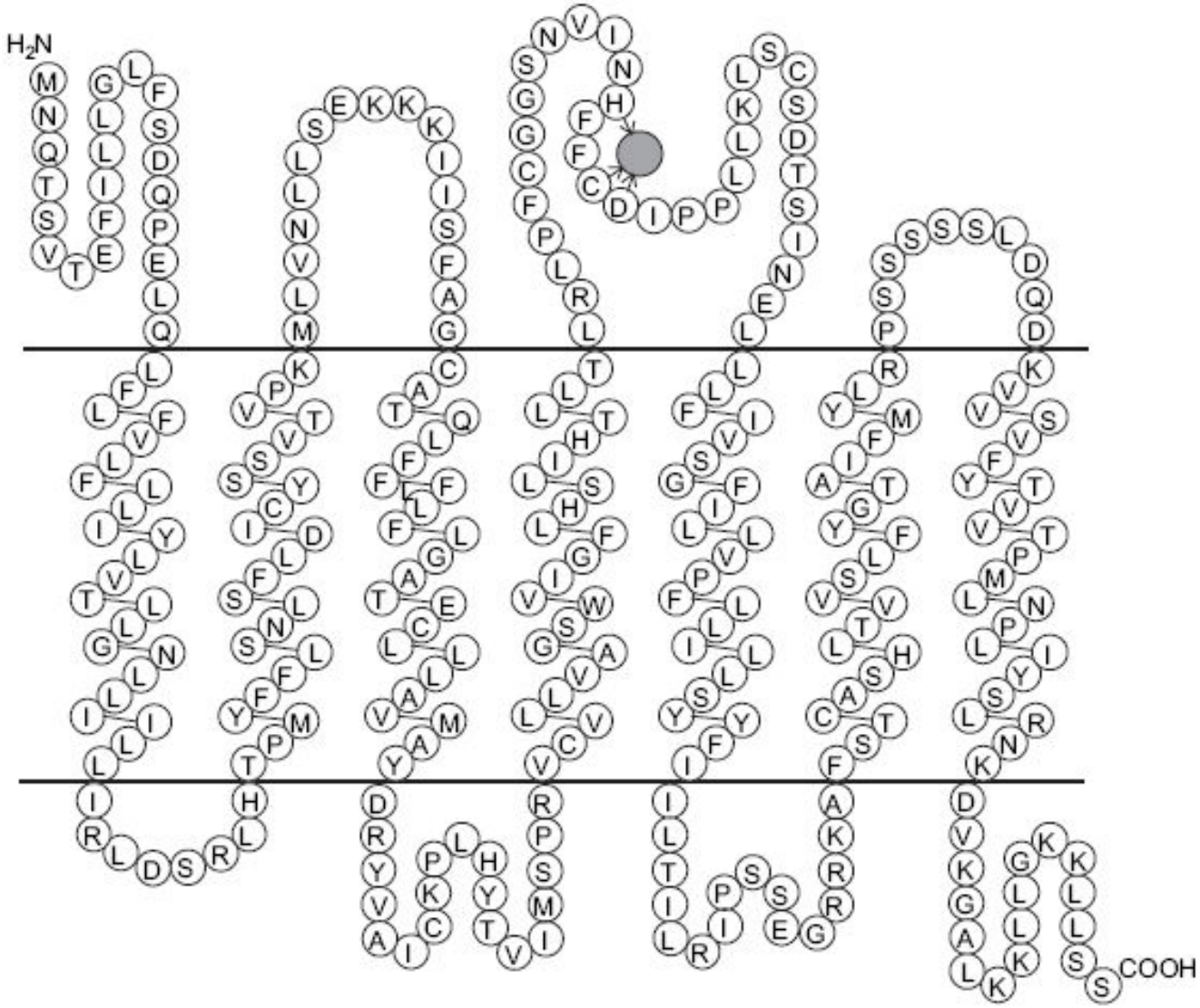
Attempting to overcome these limitations and based on previous vibrational theories, Turin (1996) proposed a transduction mechanism of primary olfactory reception suggesting that ORs act as biological spectrometers and probe the molecular vibration of a bound odorant. Therefore, ORs would be 'tuned' to the vibrational frequency of particular odorants, rather like cones in the eye are 'tuned' to certain wavelengths of light. The finding of a congenital specific anosmia to thiols or amines (Amoore, 1971) suggested the existence of specific receptors tuned to the frequency band of these functional groups. This theory was based on inelastic electron tunneling spectroscopy (IETS) (Adkins & Phillips, 1985), which relies on the interactions between electrons tunneling across a narrow gap between metallic electrodes. Metallic conductors are absent in biology, but Turin speculated that IETS was possible with proteins containing a metal ion able to interact with the odorant. This hypothesis is reasonable, given that many enzymes contain metal ions involved in electron transfer (Cass & Hill, 1980; Coleman, 1998). Recent work has further investigated the physical viability of this mechanism, and the results were consistent with observed features of smell (Brookes *et al.*, 2007). Several decades ago, Dravnieks (1962) also suggested that metals might be involved in OR activation.

A Zn(II) ion was suggested by Turin (1996) as the best candidate, given the strong link between zinc and olfaction: zinc deficiency, either dietary (Alpers, 1994), caused by treatment with histidine (Henkin *et al.*, 1975), thiocarbamides (Erikssen, Seegaard & Naess, 1975) or captopril (Zumkley *et al.*, 1985) is unique in causing a complete and rapidly reversible anosmia. Moreover, zinc is common in many metalloproteins (Coleman, 1998). Interestingly, Zn(II) is widely distributed throughout the central nervous system and is present in several regions of the brain, where it is stored in synaptic vesicles of the nerve terminals and is co-released with neurotransmitters to the synaptic gap upon neuronal activation (Frederickson, 1989; Smart, 2004). Moreover, Zn(II) binds with high affinity to and modulates the function of a number of GPCRs in neural tissues such as the tachykinin NK3 receptor (Rosenkilde *et al.*, 1998) and the β_2-adrenergic receptor (Swaminath *et al.*, 2002). Experimental assays with melanocortin MC1 and MC4 found that these GPCRs of the nervous system can be activated by Zn(II) ions, and the endogenous metal-ion site was characterized (Holst, Elling & Schwartz, 2002). These findings are consistent with the hypothesis that Zn(II) plays a key role in the activation of ORs, since they are expressed by neural cells.

The amino acid sequence CASHL (cysteine – alanine – serine – histidine – leucine) is conserved in TM6 of ORs (Fig. 1) with slight variations (Liu *et al.*, 2003), and Turin (1996) assumed that this sequence was the zinc-binding site.

(2) The metal-ion-assisted odorant recognition mechanism

Another mechanism has been proposed, based on the involvement of a metal ion in odorant recognition. The research group of K. Suslick works with metalloporphyrins and their applications as chemical sensors (artificial olfaction and molecular recognition). They have developed a colorimetric procedure to discriminate molecules based on the ability of metalloporphyrins to form selective coordination complexes with organic compounds (Rakow & Suslick, 2000), which led to the idea that a similar mechanism could be involved in olfaction. Searching the genome sequences of human ORs, it was found that the consensus sequence HxxC[DE] (histidine – two residues usually hydrophobic – cysteine – aspartic or glutamic acid) was rather conserved in the extracellular loop between the fourth and fifth TMs (4–5 loop) (Wang, Luthey-Schulten & Suslick, 2003). Actually, this motif is present in 65% of the 347 putative human ORs identified by Zozulya *et al.* (2001). To test the metal binding properties of this sequence, a pentapeptide containing this putative binding site was synthesized and analysed with circular dichroism spectroscopy, a technique used to determine protein secondary structure. The results suggested that the pentapeptide had no particular structure (random coil), as expected for a short peptide. But upon addition of Cu(II), the spectrum changed to one characteristic of an α-helix, and the equilibrium constant revealed a high coordination affinity. Similar results were observed for Zn(II) and Ni(II) (Wang *et al.*, 2003). The metal ions Zn(II) and Cu(II) were suggested as the likely candidates to be present in ORs because they strongly coordinate amines and thiols, which are strong odorants, and similar sequences containing His, Cys, Asp or Glu are usually the metal ion-binding site in zinc and copper metalloproteins (Coleman, 1998; Cass & Hill, 1980).


H2N
COOH

(3) Properties of olfaction consistent with the hypothesis of ORs as metalloproteins

(*a*) *Good ligands for metal coordination are likely to smell strongly*

One interesting pair of structurally related compounds with very different odours consists of methanol, which is relatively odourless, and methyl mercaptan, which has a highly powerful and disagreeable odour. Neither the slight differences in bond length, bond angle or reactivity, nor the slight difference in orientation of the methyl groups, seem capable of explaining such pronounced difference in odour quality and intensity. The major difference is the ability of mercaptans to form stable complexes with many metal ions. Thus, the difference in odour quality seems primarily connected with a distinct electronic behaviour (Klopping, 1971).

Acetonitrile (CH_3-C≡N:) presents a molecular structure similar to methyl isonitrile (CH_3-N^+≡C^-:). Both have large dipole moments with a lone electron pair on the terminal atom of the functional group that can play the role of acceptor in a hydrogen bond. Moreover, both are linear molecules with nearly the same size and shape. However, acetonitrile has a relatively weak, pleasant, ethereal odour, while methyl isonitrile has an extraordinarily vile and powerful odour. To account for the remarkable difference in odour quality, it was pointed out that isonitriles, unlike nitriles, react with salts of many heavy metals to form very stable complexes (Klopping, 1971).

Certain structural features of molecules tend to make them stronger odorants (Moncrieff, 1967). These and other examples led long ago to the belief that odorants that are good ligands for metal ion coordination are likely to smell strongly, and hence are detected at a lower concentration. Thiols, amines, nitriles and isonitriles, some of which are among the strongest odorants known, readily coordinate to zinc. Other strong odorants such as emoxyfurone, oxathiane, vanillin, diacetyl and pyrazine esters present structural features capable of bidentate binding to a metal ligand (Turin, 1996). This property of olfaction, hardly reconcilable with the odotope theory, can be interpreted under the assumption that ORs (or at least some of them) are metalloproteins, as suggested by Turin (1996) and the MIAOR mechanism. Thus, if a metal ion is involved in the receptor binding site, the odorants with a high affinity for metal ion coordination will bind most tightly to a specific subset of ORs, resulting in a strong odour perception (Wang *et al.*, 2003). This hypothesis would explain why odour intensity spans several orders of magnitude for compounds of similar size and volatility but different functional groups or molecular features. Some authors have interpreted the high sensitivity of human olfaction to detecting hydrogen sulphide (H_2S) and amines as an evolutionary adaptation to detect decaying food and toxic gases, that have been present for evolutionary significant time periods in the atmosphere (Doleman, Severin & Lewis, 1998).

(b) Different functional groups and even different atoms may produce similar odours

It was long ago observed that chemical compounds wit different functional groups can smell alike. One of the be known cases is the bitter-almond odour character, shared b molecules of a widely different structure (Zakarya, Yahiaoui & Fkihtetouani, 1993). Another example is that of nitrile and aldehydes: benzaldehyde and benzonitrile have simila odours, as do agrunitril and citronellal, cinnamaldehyd and cinnamalva (Turin, 1996). The nitrile group can usuall replace an aldehyde with only a minor change in odou character, making it duller and somewhat oily (Bedoukian 1986). Some molecules with an acetylenic –C≡C– tripl bond share a mustard-like smell typical of isothiocyanate (–NS), which is clearly recognizable for example in acetylen and in methyloctynoate (Turin & Yoshii, 2003). Thes findings are difficult to reconcile with the odotope theor unless we assume that they bind different receptors sharin a common perceptual pathway. The fact that about one i ten persons cannot smell the bitter-almond odour c hydrogen cyanide but perceive this odour in benzaldehyd and nitrobenzene (Kirk & Stenhouse, 1953) seems consis tent with this hypothesis. According to the MIAOI mechanism, compounds with different functional grou that produce a similar smell probably share a similar abilit to form a coordinate bond with a metal ion, thoug additional chemical properties and steric constraints ma also be involved. Turin's (1996) hypothesis would be tha they share some similar pattern in vibrational spectra.

(c) Molecules with an almost identical structure may smell different

Ferrocene and nickelocene are composed of a metal ion of Fe(II) and Ni(II), respectively, almost completely encased by two cyclopentadienyl rings (Fig. 3). The resulting coordination complex is hydrophobic and volatile and the structures are nearly identical. However, ferrocene has a camphoraceous odour reminiscent of chloroalkanes, while nickelocene smells oily-chemical (a typical cycloalkene odour) (Turin, 1996). Although the slight variations in molecular shape might account for differences in the repertoire of activated ORs, their different smell can also be interpreted as resulting from a different affinity to form a coordinate bond with a metal ion, given that each encased metal atom (Fe^{2+} or Ni^{2+}) produces a hybridised resonant orbital of unique characteristics.

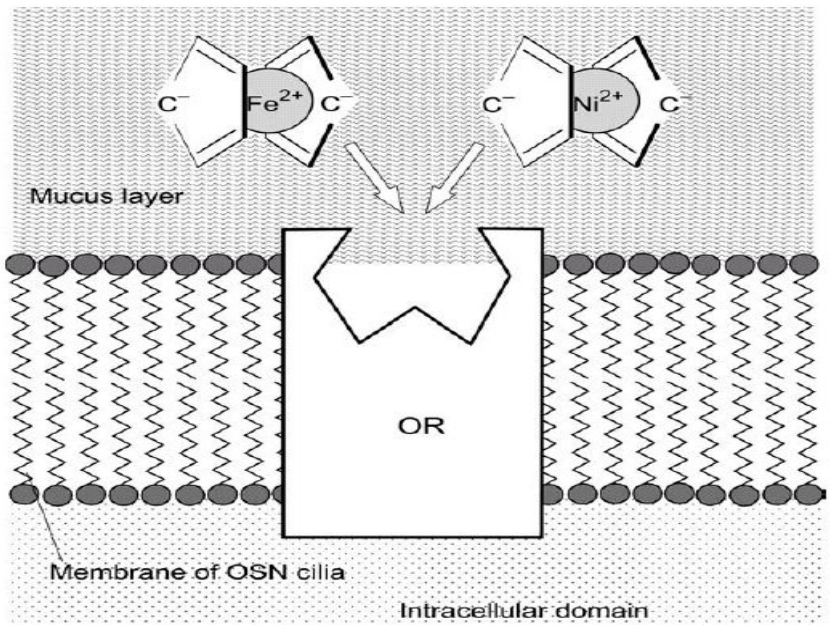


Fig. 3. Ferrocene and nickelocene: same molecular shape but different smell. Two cyclopentadienyl ions coordinating a Fe(II) cation become a ferrocene molecule (*upper left*). Same structure for nickelocene, replacing Fe(II) by Ni(II) (*upper right*). The structures are nearly identical, since the atomic radii of the metals are very similar (1.72 Å for Fe and 1.62 Å for Ni), which suggests *a priori* that they are likely to activate the same set of olfactory receptors (ORs). However, this is not the case, since they smell different. This observation is consistent with the hypothesis that at least some ORs are metalloproteins able to discriminate the fine electron orbitals of resonant structures. OSN, olfactory sensory neuron.

Isotope effects

Another finding consistent with Turin's (1996) vibrational theory but difficult to explain by the odotope theory is that some isotopes produce a different smell compared to their parent compounds, despite their identical structure; they only differ in the number of neutrons of some atoms. Differences between the odour of deuterated and regular benzaldehyde have been described (Haffenden, Yaylayan & Fortin, 2001). Dimethyl sulphide was reported to smell repulsive, green and cabbage-like, but its fully deuterated analogue dimethylsulphide-d_6 smells cleaner, more truffle-like, without the gassy cabbage-like note of the parent compound (Turin & Yoshii, 2003). Similarly, acetophenone and acetophenone-d_8 produce a similar but not identical odour profile that can be distinguished by trained experts. Acetophenone-d_8 has stronger fruity and bitter-almond notes, while acetophenone smells more like toluene (Turin, 1996). These differences were not found in a later report (Keller & Vosshall, 2004), maybe because panelists were not experts in odour description. Computational studies could help to determine if reported variations in smell correspond to a different affinity for metal coordination.

Резкая граница по размерам молекул при их детектировании

Не все молекулы пахнут. Во первых, требуется определенная летучесть чтобы достичь обонятельного эпителия в носу и молекулы с МВ>300Да не пахнут.
Давление пара быстро уменьшается с увеличением размера молекулы, но молекулы с МВ >300Да могут иметь значительные давления пара.Это означает, что они слишком велики, чтобы подходить рецепторному участку. Этот эффект обрезания особенно виден для муксусных одорантов. Наиболее поразительный пример такого резкого обрезания – замена атома углерода в бензеноидном муксусе на атом кремния приводит к исчезновению запаха. Большинство молекул с запахом муксуса имеют пониженную гибкость, которая может быть связана с резким обрезанием. Монкриф (1967) предположил, что гибкая молекула имеет больше возможностей приспособиться к рецепторному участку, тогда как жесткая молекула связывается только с одним типом сайта. Это означает, что гибкие молекулы такие как углеводороды не должны иметь резкое обрезание как муксусы, однако для подтверждения этой гипотезы нужны экспериментальные данные. Другая гипотеза – влияние размера на связывание с транспортным белком. Это ограничение может определять проявление запаха.

Одоранты декодируются по комбинаторному механизму

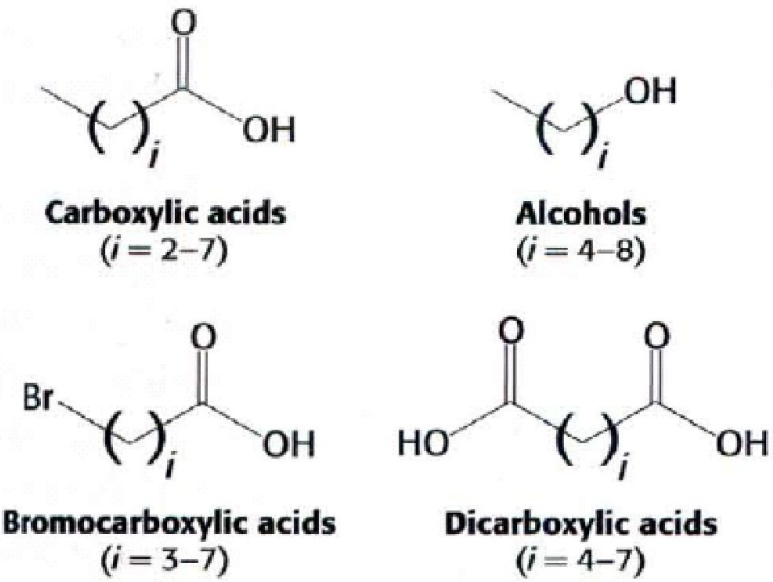
Проблема обонятельной рецепции - как сопоставить каждый обонятельный рецептор (ОР) из большого семейства ОР одному или нескольким одорантам. В этом направлении был достигнут большой прогресс. Первоначально ОР сопоставляли с одорантами путем экспрессии единственного специфического гена у крыс. Этот ОР реагировал на линейные альдегиды, более сильно на н-октаналь, менее сильно на н-гептаналь и н-гексаналь.

Больший прогресс был достигнут при использовании каскада трансформации сигнала от ОР. Одна из секций назального эпителия была нагружена чувствительным к Са красителем Fura-2. Затем ткань обрабатывали различными одорантами по очереди и определенной концентрации. Если одорант связывался с ОР и активировал его, его нейрон можно было обнаружить под микроскопом по изменению флуоресценции, обусловленному входом Са, что происходит в ходе процесса трансдукции сигнала. Чтобы определить, какой ОР ответственен за сигнал, с-ДНК генерировалась из м-РНК, которую изолировали из единичных идентифицированных нейронов. С-ДНК затем подвергали ПСР с использованием праймеров, которые эффективны в усилении большинства или всех генов. Затем последовательность ПСР продуктов от каждого нейрона определяли и анализировали.

Четыре серии одорантов были протестированы на взаимодействие с ОР

Используя этот подход, были проанализированы отклики нейронов на серию соединений с различной длиной цепи и конечными функциональными группами.Результаты этих экспериментов на первый взгляд удивительны

Оказалось, что нет простого 1:1 соответствия между одорантами и рецепторами
Почти каждый одорант активирует целый ряд рецепторов (обычно в разной степени)
Почти каждый рецептор активируется более, чем одним одорантом.
Однако, важно, что каждый одорант активирует уникальную комбинацию ОР. В принципе, этот комбинаторный механизм позволяет даже небольшому числу ОР различать громадное число одорантов



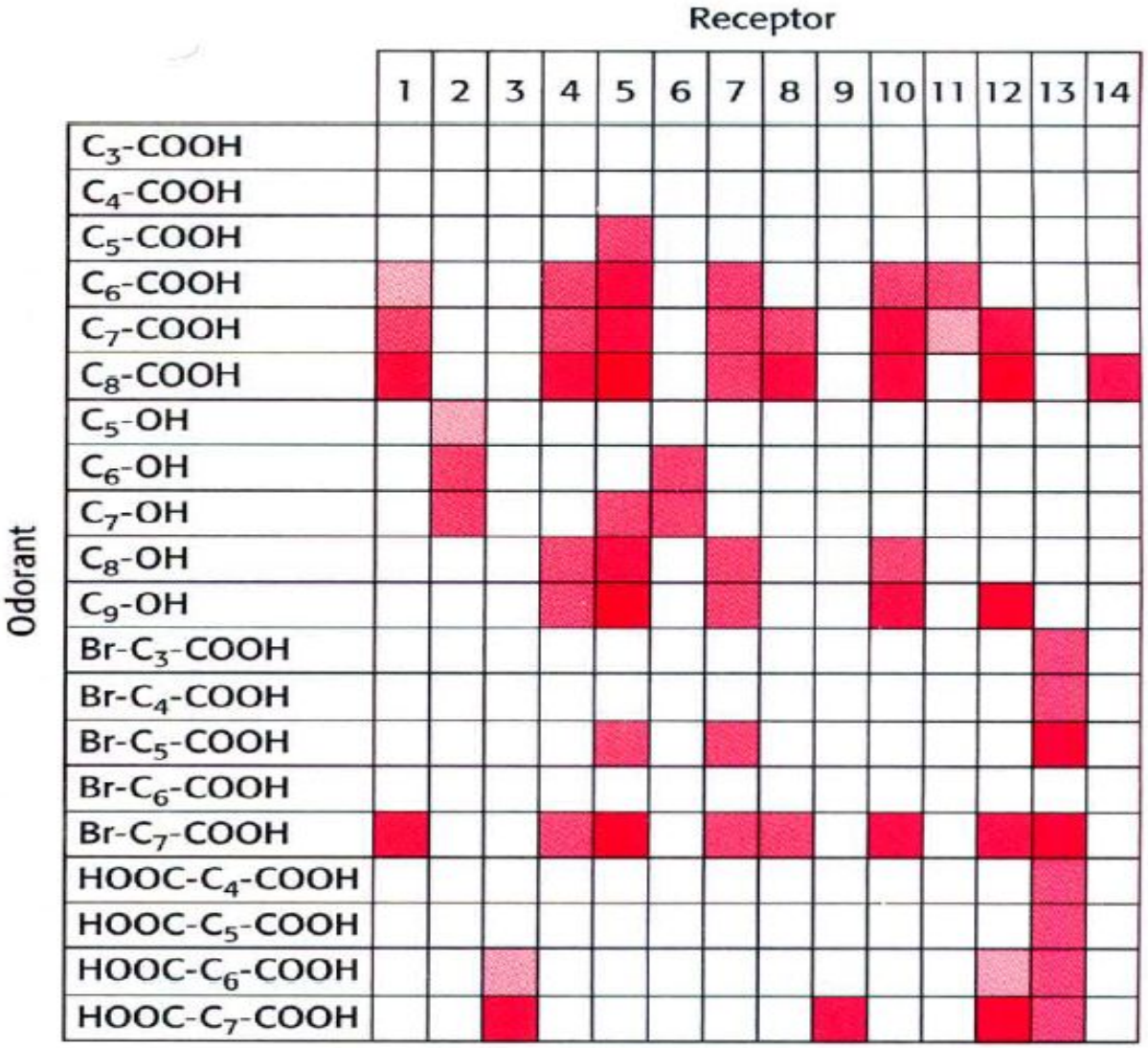


Figure 32.7 Patterns of olfactory-receptor activation. Fourteen different receptors were tested for responsiveness to the compounds shown in Figure 32.6. A colored box indicates that the receptor at the top responded to the compound at the left. Darker colors indicate that the receptor was activated at a lower concentration of odorant.

Как информация о том, какой ОР активировался данным одорантом, передается в мозг? Нужно вспомнить, что каждый нейрон экспрессирует только один ОР и что картина экспрессий повидимому является случайной. Существенный ключ к связи между ОР и мозгом был обнаружен при использовании мыши, которая экспрессирует ген для легко детектируемого окрашенного маркера в сочетании со специфическим ОР геном. Обонятельные нейроны, которые экспрессируют комбинацию ОР- маркер-белок,были прослежены до их конечного места назначения в мозгу до структуры, « обонятельная луковица» (см. рис.) Было обнаружено,что процессы от нейронов, которые экспрессируют один и тот же ОР ген, связаны с одним и тем же местом в обонятельной луковице. Более того, эта картина связывания нейронов оказалась идентичной во всех обследованных мышах. Таким образом, нейроны, которые экспрессируют специфические ОР, связаны со специфическими сайтами в мозгу. Это свойство позволяет создать пространственную карту нейрональной активности зависящих от одоранта откликов на одоранты внутри обонятельной луковицы.

Figure 32.8 Converging olfactory neurons. This section of the nasal cavity is stained to reveal processes from sensory neurons expressing the same olfactory receptor. The processes converge to a single location in the olfactory bulb. [From P. Mombaerts, F. Wang,

Может ли такой комбинаторный механизм реально различать много различных одорантов? Электронный нос, который функционирует по тому же принципу, дает убедительное док-во, что может. (см. рис 32.9.) В случае электронного носа рецепторами являются полимеры, которые способны связывать ряд небольших молекул. Каждый полимер связывает каждый одорант, но в различной области. Важно, что электрические свойства этих полимеров изменяются при связывании одоранта. Совокупность из 32 полимерных сенсоров, соединенных вместе, так что картина откликов может быть оценена, способна различить такие индивидуальные соединения, как н-пентан и н-гексан , а также сложные смеси, такие как запахи свежих и испорченных фруктов.

Figure 32.9 The Cyranose 320. The electronic nose may find uses in the food industry, animal husbandry, law enforcement, and medicine. [Courtesy of Cyrano Sciences.]

Functional Magnetic Resonance Imaging Reveals Regions of the Brain Processing Sensory Information

Can we extend our understanding of how odorants are perceived to events in the brain? Biochemistry has provided the basis for powerful methods for examining responses within the brain. One method, *functional magnetic resonance imaging* (fMRI), takes advantage of two key observations. The first is that, when a specific part of the brain is active, blood vessels relax to allow more blood flow to the active region. Thus, a more active region of the brain will be richer in oxyhemoglobin. The second observation is that the iron center in hemoglobin undergoes substantial structural changes on binding oxygen (p. 185). These changes are associated with a rearrangement of electrons such that the iron in deoxyhemoglobin acts as a strong magnet, whereas the iron in oxyhemoglobin does not. The difference between the magnetic properties of these two forms of hemoglobin can be used to image brain activity.

Nuclear magnetic resonance techniques (p. 98) detect signals that originate primarily from the protons in water molecules but are altered by the magnetic properties of hemoglobin. With the use of appropriate techniques, images can be generated that reveal differences in the relative amounts of deoxy- and oxyhemoglobin and thus the relative activity of various parts of the brain.

These noninvasive methods reveal areas of the brain that process sensory information. For example, subjects have been imaged while breathing air that either does or does not contain odorants. When odorants are present, the fMRI technique detects an increase in the level of hemoglobin oxygenation (and, hence, brain activity) in several regions of the brain (Figure 32.10). Such regions include those in the primary olfactory cortex as well as other regions in which secondary processing of olfactory signals presumably takes place. Further analysis reveals the time course of activation of particular regions and other features. Functional MRI shows tremendous potential for mapping regions and pathways engaged in processing sensory information obtained from all the senses. Thus, *a seemingly incidental aspect of the biochemistry of hemoglobin has yielded the basis for observing the brain in action.*

Figure 32.10 Brain response to odorants. A functional magnetic resonance image reveals brain response to odorants. The light spots indicate regions of the brain activated by odorants. [From N. Sobel et al., *J. Neurophysiol.* 83(2000):537–551; courtesy of Dr. Noam Sobel.]

CONCLUSIONS

Обоняние – это химическое восприятие, которое производит ощущение и дискриминацию летучих химических веществ. Оно играет ключевую роль в выживании, идентификации хищников или ядов.Оно участвует в коммуникации между животными. Поэтому выяснение механизмов обоняния даст, в частности, лучшее понимание поведения животных.

Запахи детектируются большим числом рецепторов, синтезируемых в обонятельном эпителии носа животного. Со времени открытия ОР большой прогресс был достигнут в понимании физиологических основ обоняния. Одоранты узнаются посредством комбинаторной кодирующей схемы, которая объясняет, как несколько сотен различных рецепторов могут различать тысячи различных молекул. Комбинаторная теория кодирования запаха должна включать перирецепторные события, состояще в транспорте и биотрансформации одоранта: данный одорант может активировать или ингибировать различные комбинации рецепторов, ОСБ, или ферментов биотрансформации, в то время как каждый из белков, участвующих в транспорте одоранта, узнавании и трансформации может быть активирован или ингибирован различными молекулами. Этот сложный сценарий демонстрирует большую трудность в моделировании характера запаха и его интенсивности, но дает научную основу для рационального дизайна одорантов.

ОР принадлежат к семейству рецепторов, действующих через G-белки, которое охватывает большое число рецепторов, реагирующих на разнообразные стимулы. Последовательности всех интактных генов в настоящее время известны лишь для некоторых животных. В различных исследованиях анализировались и сравнивались различные ОР геномы, что привело к возникновению ряда интересных гипотез о об эволюционных аспектах обонятельной рецепции. Так, недавно было предположено, что человеческий ОР геном изменяется с довольно большой скоростью, чтобы сохранить возможности обонятельной рецепции,которые подвергаются давлению (вытеснению) со стороны геномов зрения и слуха. С этой гипотезой согласуются недавние исследования, в которых обнаружено разнообразие в человеческих ОР геномах, которое может объяснить разнообразие в восприятии запахов у отдельных индивидуумов.

Большой набор ОР в обонятельном эпителии обычно рассматривают как неспецифическое химическое восприятие, который возникал по мере необходимости узнавать летучие химические соединения. Другая важная функция - это использование обонятельной рецепции для коммуникации среди животных путем узнавания специфических молекул, которые действуют как социальные химические сигналы. Такие соединения как амины или пептиды участвуют в индивидуальном узнавании, выборе партнера или взаимодействии между родителями и детьми. Механизм, посредством которого животные могут узнавать друг друга по запаху, довольно сложен и включает гены иммунной системы. Полученные к настоящему времени данные обнаруживают молекулярный механизм, посредством которого индивидуум может чувствовать совместимость молекул иммунной системы партнера и соответственно Обеспечивать нужное социальное поведение. Функциональный анализ генома носа животных показывает, что использование обоняния позволяет избежать инбридинг, увеличить иммунокомпетенцию и большую устойчивость к патогенам.

Несмотря на прогресс в понимании физиологических основ обоняния, молекулярные основы восприятия запахов и конформационные изменения при связывании одорантов поняты недостаточно. В некоторых случаях характер и интенсивность запаха связаны с присутствием определенных функциональных групп в молекуле и различные авторы предположили , что обонятельная система чувствительна к тонкой структуре Электронного распределения в функциональной группе. Гипотеза, что ион металла участвует в узнавании запаха, основана на догадке, однако она дает естественную интерпретацию этого факта и других особенностей обоняния, которые еще полностью не поняты. Согласно этой гипотезе Тьюрин (1996) предложил механизм, основанный на спектроскопии неупругого туннелирования электрона , который не получил признания вследствие того, что он не был найден в биологических системах.
Узнавание одорантов с использованием ионов металлов предполагает также, что обонятельные рецепторы являются металлопротеинами. Однако, несмотря на недавний прогресс в понимании основ обонятельной рецепции, не появилось ясных свидетельств, что этот механизм существует или не существует. Поэтому для дальнейших исследований весьма важно выяснить возможную роль ионов металлов в обонятельной рецепции.