

# Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra: Obecné zootechniky a etologie

Centrum pro výzkum chování psů



**Teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické receptce**

**Bakalářská práce**

**Vedoucí práce:** Pinc Ludvík, Ing.

**Autor práce:** Vochemůrková Eliška

**2012**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické receptce vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne: 4. 4. 2012

Eliška Vochomůrková

***Poděkování***

*Chtěla bych tímto poděkovat Ing. Ludvíku Pincovi za odborné vedení mé literární práce.*

## **Souhrn**

Čichový systém savců je schopen rozlišit obrovské množství odlišných pachových molekul, které jsou detekovány hlavním olfaktorickým epitelem. V tomto epitelu jsou lokalizovány olfaktorické geny, které kódují olfaktorické receptory. Savci jsou vybaveni zhruba 500 - 1500 olfaktorickými geny. Počet těchto genů je závislý na druhu savce. Primáti a lidé mají nižší počet olfaktorických genů s vyšším počtem pseudogenů, zatímco u psů nebo u potkanů je tomu naopak. Tyto druhy mají vysoký počet olfaktorických genů a nízký počet pseudogenů. Na olfaktorických receptorech probíhá interakce s molekulami pachu. Princip této interakce zatím nebyl plně objasněn. Teorie vycházející z teorie tvaru molekuly tvrdí, že olfaktorické receptory reagují pouze na dílčí strukturální rysy molekuly pachu – odotopy. Tyto odotopy reagují s určitými receptory, jako když zapadne klíč do zámku. Takto dle výše zmíněných teorií vzniká nervový vzruch, který je dále veden do čichového kyje a vyšších mozkových center.

Jiní autoři se domnívají, že olfaktorický receptor reaguje v závislosti na vibracích molekul. Vibrační teorie však nebyla schopna navrhnout žádný přijatelný mechanismus na bázi bílkovinné spektroskopie a nevysvětlovala, proč mají stereoizomery odlišný pach. Proto Luca Turin navrhl teorii spektroskopie nepružného elektronového tunelování, která tvrdí, že by nos mohl pracovat jako biologický spektroskop a prakticky zde vysvětluje, jak by mohl transdukční mechanismus pracovat na principu rozeznávání molekul pomocí jejich vibračního spektra.

Dosud nebyla ani jedna z teorií podložena přesvědčivým důkazem. U každé teorie existují případy, ve kterých byla daná teorie potvrzena, ale i vyvrácena. Je tedy pravděpodobné, že interakce mezi odoranty a olfaktorickými receptory pracuje na docela odlišném mechanismu nebo v doposud navržených teoriích chybí určitá část, která by vysvětlovala, proč se v daných případech teorie mýlí.

### **Klíčová slova:**

Primární olfaktorická recepce, olfaktorický subgenom, olfaktorické receptory, olfaktorický epitel, olfaktorický bulbus, odorant

## Summary

Mammalian olfactory system is able to distinguish a huge number of different odor molecules which are detected by the main olfactory epithelium. Olfactory genes which encode olfactory receptors are located on the olfactory epithelium. Mammals are equipped with about 500 - 1500 olfactory genes. The number of genes is dependent on the species of mammal. Primates and humans have a lower number of olfactory genes with a higher number of pseudogenes, whereas the dog and rat have a high number of olfactory genes and low number of pseudogenes. The olfactory receptors interact with odor molecules, however the process has not been sufficiently discovered and made clear but there are a lot of theories.

One such theory is based on the idea of the shape of molecule and claim that olfactory receptors respond to specific structural features of odor molecules – odotopes - like a key fits into a lock. Nervous stimulation is routed into the olfactory bulb and further to the higher brain centers.

Other authors argue that the olfactory receptor responds according to the vibrations of molecules. Since vibration theory was unable to suggest any reasonable process for protein-based spectroscopy and didn't explain why has stereoisomers different smell. Luca Turin suggested theory of inelastic electron tunneling spectroscopy, therefore claiming that the nose could function as a biological spectroscope. This theory has been practically supported and explained by means of that a transduction mechanism could operate on the principle of recognition molecules by their vibrational spectrum.

While neither theory has been confirmed by convincing evidence, each theory does have cases where the theory was proven. It is likely that the interaction between odor and olfactory receptors are working in quite a different ways or that theories are incomplete, which explains why this theories are wrong in specific cases.

### **Key words:**

Primary olfactory reception, olfactory subgenom, olfactory receptors, olfactory epithelium, olfactory bulb, odorant

<b>Obsah:</b>	
Souhrn	3
Summary	4
<b>1. Úvod</b>	<b>6</b>
<b>2. Cíl</b>	<b>7</b>
<b>3. Literární rešerše</b>	<b>8</b>
3.1 <i>Anatomie a fyziologie čichu</i>	8
3.1.1 Vnější nos	8
3.1.2 Hlavní olfaktorický systém	9
3.1.2.1 Čichová sliznice	9
3.1.2.2 Čichový kyj	11
3.1.2.3 Čichová kůra	13
3.1.3 Vomer nazální orgán	14
3.1.4 Septální orgán	16
3.1.5 Gruenbergerovo ganglium	17
3.1.6 Přenos signálu v olfaktorickém systému	17
3.2 <i>Objev a charakterizace olfaktorických receptorů</i>	18
3.2.1 Olfaktorické receptorové proteiny	19
3.2.1.1 Klíčová rezidua aminokyselin v olfaktorických receptorech	20
3.2.1.2 Strukturální změny v olfaktorickém receptoru během navázání odorantu	20
3.2.2 Charakterizace proteinů vázajících odoranty	21
3.3 <i>Rané teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické receptce</i>	22
3.3.1 Odoranty	22
3.3.2 Teorie tvaru molekuly	23
3.3.3 Vibrační teorie	23
3.4 <i>Moderní teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické receptce</i>	25
3.4.1 Odotopová teorie	25
3.4.2 Teorie spektroskopie nepružného elektronového tunelování	27
3.4.2.1 Mechanismus rozeznávání odorantů založený na spektroskopii nepružného elektronového tunelování	27
<b>4. Závěr</b>	<b>29</b>
<b>5. Seznam literatury</b>	<b>30</b>
<b>6. Seznam použitých zkratk</b>	<b>38</b>

# 1. Úvod

Čich je fylogeneticky velmi starým smyslem, kterým jsou savci schopni detekovat obrovské množství chemických látek ze svého okolí. Pro většinu savců je čich jedním z nejdůležitějších smyslů, u psovitéch šelem je tento smysl v podstatě nepostradatelný. Prozatím však nebylo plně objasněno, jak čichový systém pracuje a je schopen detekovat takové množství pachových látek. Především není zřejmé, jak probíhá interakce mezi molekulou pachu a olfaktorickým receptorem. Objasnění fyziologie čichu by napomohlo k porozumění nejen chování savců, ale především v odvětví, kde je zapotřebí spolupráce psa a člověka. Dalo by se plně využít olfaktorických schopností psa, kterých člověk používá v široké škále oborů. Psi jsou schopni ztotožňovat individuální pachy lidí a sledovat pachovou stopu. Zároveň jsou schopni rozeznat, jakým směrem stopa vede. Psi jsou v tomto případě schopni řídit se pachovým gradientem. Díky tomu jsou psi využíváni při detekci drog, výbušnin, zbraní, zbytků hořlavých kapalin a exotických zvířat a rostlin. Byly prováděny studie, ve kterých psi byli schopni detekovat počínající zhoubná nádorová onemocnění. Porozuměním fyziologie čichu bychom byli schopni vysvětlit falešné značení psů při detekci vybraných látek a předejít těmto situacím.

Dále by se těchto vědomostí plně využilo v parfumérském průmyslu. Mnoho odorantů totiž voní jinak při odlišných koncentracích. V případech mísení odorantů může být konečný pach naprosto odlišný od těch, které byly původně použity. Objasnění této problematiky by napomohlo při vytváření nových parfémů, které by byly schopny pracovat jako atraktanty či měly naprosto averzivní charakter.

## **2. Cíl**

Cílem práce je vypracovat literární rešerši, která poskytne přehled teorií vysvětlujících interakci mezi molekulami odorantů a olfaktorickými receptory.



## 3. Literární rešerše

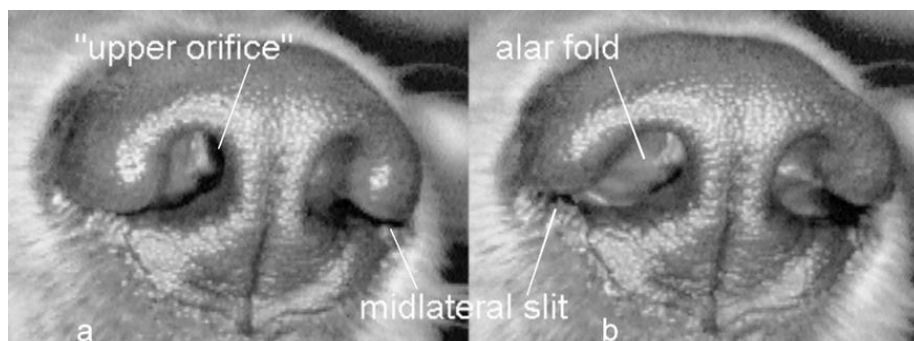
### 3.1 Anatomie a fyziologie čichu

Čichový systém nepracuje po jednotlivých částech, ale na principu několika spolupracujících subsystémů. Patří sem hlavní olfaktorický epitel, vomeronazální orgán, septální orgán a Gruenebergovo ganglium (Breer et al., 2006).

#### 3.1.1 Vnější nos

Vnější nos slouží k přenosu molekul odorantu z vnějšího prostředí k olfaktorickým receptorům (Menco et Morrison, 2003). U psa domácího (*Canis familiaris*) jako podklad pro nozdry slouží chrupavčitá část nosní přepážky a postranní nosní chrupavky. Mediální a laterální obvod nozdry ohraničují nosní křídla, která se spojují v dorzální a ventrální spojce (Černý, 2002).

Vnější nos je u psa uzpůsoben tak, že vdechovaný vzduch je nasáván nozdrami a vydechovaný proudí postranními hlubokými žlábkami (*sulcus alaris*) šikmo dozadu za nosní houbu (obr. 1). Toto uzpůsobení umožňuje psovi ověřovat pach před sebou, aniž by byl pach uvolňovaný ze zdroje odvanut proudem vydechovaného vzduchu (Settles et al., 2002). Psi jsou schopni díky teplému vydechovanému vzduchu zvednout ze země odoranty s vyšší molekulovou hmotností a tím cítit pachy, které by jinak nebylo možné detekovat. Teplý vzduch rovněž zvyšuje vypařování látek za nízkých teplot, což psům umožňuje pracovat i za velmi nízkých teplot (Craven et al., 2010).



Obrázek 1.: Nozdry psa při vdechu (a) a při výdechu (b), (Settles et al., 2002).

## 3.1.2 Hlavní olfaktorický systém

### 3.1.2.1 Čichová sliznice

Výstelka nosní dutiny se rozděluje na výstelku nosní předsíně a sliznici nosní dutiny. Výstelka nosní předsíně je tvořena vrstevnatým dlaždicovým epitelem, který se na okraji nozder stýká s kůží a kaudálně přechází v respirační epitel. Sliznice nosní dutiny je dělena na olfaktorickou (čichovou) a respirační sliznici. Olfaktorická sliznice se vyskytuje v kaudální části nosní dutiny a pokrývá oblast kostěného čichového bludiště. Má šedožlutou barvu na rozdíl od respirační sliznice, která je růžová až načervenalá a vystýlá zbytek nosní dutiny (Černý, 2002). Olfaktorická sliznice se skládá se ze tří vrstev. První je tenká vrstva hlenu, druhou vrstvu tvoří epitel a třetí vrstva je lamina propria. Epitel je ve své podstatě stejný u všech obratlovců. Skládá se ze sensorických buněk (olfaktorických neuronů), podpůrných a bazálních buněk (Farbman, 1992).

Olfaktorické neurony jsou bipolární, zakončené dendritickým knoflíkem zanořeným ve vrchní části epitelu, na jehož povrchu jsou cillie (cilia) zanořené v sekretu (obr. 2). Tvar dendritického knoflíku i počet cilií je podle druhu variabilní. U psa je dendritický knoflík dlouhý 4  $\mu\text{m}$  a silný 1, 5  $\mu\text{m}$ , kdy množství cilií na jednom dendritickém knoflíku bývá v průměru od 10 do 15 (Farbman, 1992). Délka dendritů je různorodá, většinou jsou téměř po celé hloubce epitelu, ale některé mohou být krátké a ležet na povrchu epitelu (Moran et al., 1982). Cilie se skládají z krátkých proximálních částí, které se zužují do delších a tenčích distálních částí, zarovnaných paralelně na povrchu epitelu. Cilie v olfaktorické sliznici jsou delší než na respiračním epitelu. U většiny savců se jejich délka pohybuje okolo 50  $\mu\text{m}$  (Seifert, 1970). V membráně cilií se nacházejí olfaktorické receptory, což jsou řetězce aminokyselin, které sedmkrát prostupují buněčnou membránou (Buck et Axel, 1991). Zde dochází k primární akci olfaktorické transdukce. Tyto receptory patří do skupiny GPCR (receptory spřažené s G – proteiny). G – protein je zde důležitý pro aktivaci cAMP (Getchell, 1986).

Předpokládá se, že na každém olfaktorickém neuronu se nachází jeden typ olfaktorických receptorů. Neurony vybavené stejným typem receptorů mohou být odděleně ve vymezených oblastech čichového epitelu. Tyto oblasti nejsou ostře ohraničeny, ale překrývají se. Je pravděpodobné, že toto uzpůsobení do prostorově omezených oblastí je z důvodu rozdílného proudění vzduchu. Také by mohlo mít spojitost s faktem, že neurony nesoucí stejný typ receptoru vstupují axony do stejného glomerulu (Breer et al., 2006; Breer et Strotmann, 1997).

V olfaktorické sliznici existuje unikátní skupina olfaktorických receptorů zvaná OR37. Tato skupina se vyznačuje připojením šesti aminokyselin do třetí extracelulární smyčky (loop). Rozšířené smyčky v OR37 mají vysoký obsah aminokyselin, které jsou zejména na jedné straně šroubovice. Toto speciální uspořádání OR37 naznačuje, že by mohly sloužit k rozeznávání speciálních pachových ligandů. Při srovnání různých druhů savců se ukázalo, že tato skupina je ve větší či menší míře obsažena např.: u myši, slona, psa, primátů a člověka. U člověka tato skupina vykazuje překvapivě vysoký podíl. OR37 byly prokázány již u fylogeneticky starých savců, jako jsou vačice. U jiného druhu než u savců tato skupina nebyla nalezena, proto je pravděpodobné, že OR37 slouží k specifickým funkcím spjatým právě se savci (Breer et al., 2006).

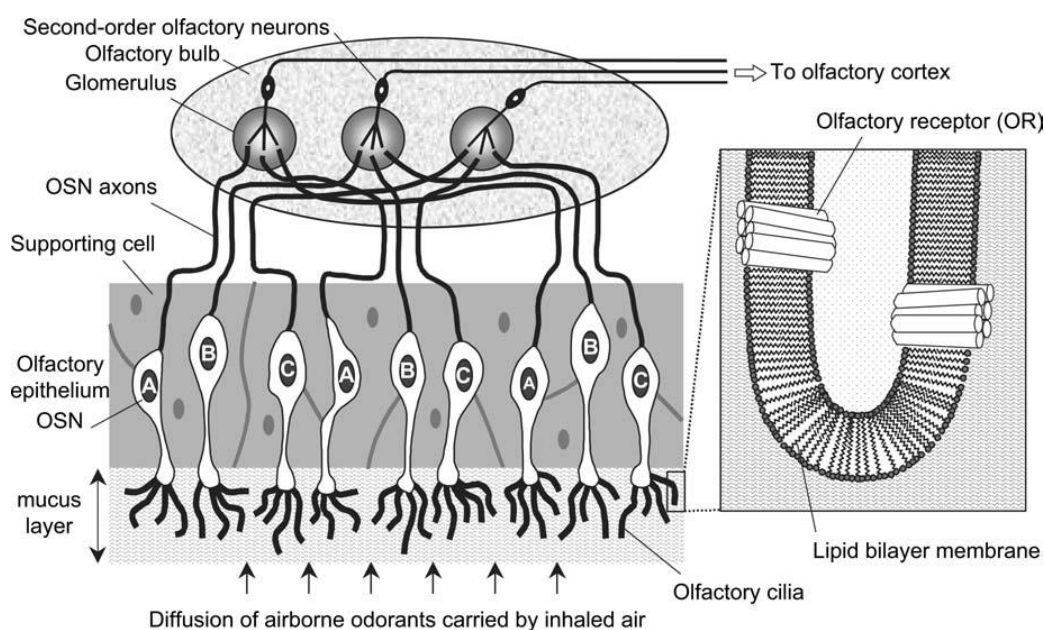
Vzruch je veden po olfaktorickém neuronu od povrchu sliznice přes řešetnou ploténku do olfaktorického bulbu (Getchell, 1986). Axony olfaktorických neuronů se sbíhají do klubíčkovitých útvarů zvaných glomeruly, které se nachází v olfaktorickém bulbu (Zou et al., 2001). Axony olfaktorických neuronů vznikají v bazální oblasti receptorových buněk a předávají informace o intenzitě a kvalitě pachu do mozku. Jsou vždy nemyelizované a patří k nejjemnějším vláknům v nervovém systému (Doucette, 1992).

V olfaktorické sliznici jsou sloupcovité podpůrné buňky (Menco et al., 1998) a jejich apikální část je pokryta dlouhými ciliemi, které sahají do svrchní vrstvy sekretu na povrch sliznice, zde se mísí s tenkou distální částí olfaktorických cilií (Seifert, 1970). Těla olfaktorických receptorů, dendrity a axony jsou obklopeny rozšířeními podpůrných buněk (Morrison et Costanzo, 1990), což vede k všeobecnému přesvědčení, že podpůrné buňky mají vlastnosti gliových buněk, ačkoliv se jim stavbou nepodobají (Menco et Morrison, 2003). To potvrzuje přítomnost proteinu S – 100 u některých savců, což je biochemický marker gliových buněk (Rambotti et al., 1989). Podpůrné buňky regulují rozmístění iontů a vody v mukóze (Menco et al., 1998). A dále se pak spolu s Bowmanovými žlázkami podílejí na metabolismu cizích látek (Carr et al., 2001).

V olfaktorické sliznici se nacházejí dva druhy bazálních buněk - horizontální a kulovité. V průměru jsou velké 4 – 7  $\mu\text{m}$  a mají centrálně umístěné jádro. Bazální buňky slouží jako prekurzory pro vytváření olfaktorických neuronů v dospělosti, čímž se podílejí se na zotavení olfaktorického epitelu ze zranění a pomáhají udržovat jeho strukturální integritu (Holbrook et al., 1995). Díky bazálním buňkám jsou tedy olfaktorické neurony schopné po poškození regenerovat na rozdíl od většiny nervových buněk (Huard et al., 1998). Je to dáno tím, že oproti jiným neuronům mají olfaktorické neurony krátkou životnost. Ta se pohybuje v řádu několika měsíců, což může být způsobeno tím, že jsou vystaveny různým infekčním a

toxickým látkám z venkovního prostředí. To staví bazální buňky do hlavní úlohy při vzniku nových neuronů a tím udržení schopnosti reagovat na odoranty (Menco et Morrison, 2003).

Lamina propria je dvakrát až třikrát silnější než epitel. Skládá se z kolagenních a elastických vláken, pojivového vaziva, fibroblastu, makrofágů, leukocytů a trojklaného nervu. Nachází se zde Bowmanovy žlázy, které ze své zadní části produkují hlenový sekret. Hlen chrání epitel před vysušením, teplotními extrémy, poškozením a infekcí (Farbman, 1992). Jeho nejdůležitější funkcí je rozpuštění odorantů, které pak dráždí cilie na dendritickém knoflíku (Butler et Hodos, 2005). Kromě sekretu produkují i vazebné proteiny, které usnadňují dopravu odorantů k olfaktorickým receptorům (Pixley et al., 1997).



Obrázek 2.: Schéma průřezu hlavním olfaktorickým epitelem a olfaktorickým bulbem (Zarzo, 2007).

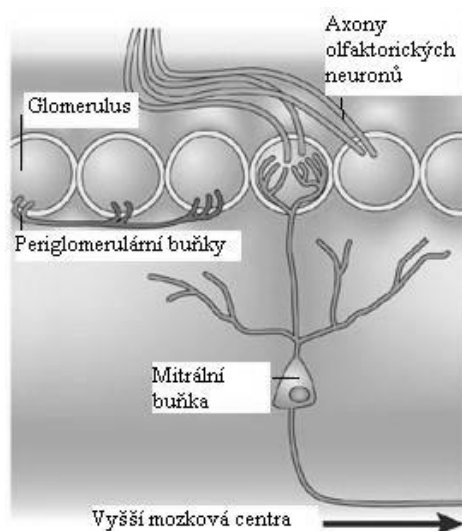
### 3.1.2.2 Čichový kyj

Čichový kyj neboli olfaktorický bulbus (*bulbus olfactorius*) je specializovaná část mozku, která leží přímo nad čichovou kostí v předním mozku (Butler et Hodos, 2005). Sbírá informace z epitelu od různých typů olfaktorických neuronů, segreguje je a předává dále do vyšších center v mozku (Zou et Buck, 2006). Velikost olfaktorického bulbu (OB) je opět proměnná podle druhu živočicha. Podle rozdělení na makrosomatické a mikrosomatické savce mají makrosomatictí savci oproti mikrosomatickým OB velký a dobře rozvinutý. Podněty z vomeronazálního orgánu přicházejí do přídatného olfaktorického bulbu (Butler et Hodos, 2005).

V OB vstupují axony olfaktorických sensorických neuronů do specifického glomerulu. Axony téhož neuronu se sbíhají do jednoho nebo několika glomerulů, kterých je v OB asi 2000 (Smith et al., 1991). Vassar et al. (1994) uvádí u savců 1000 – 3000 glomerulů a 80 u ryb. V glomerulech axony olfaktorických neuronů tvoří synapse s dendrity mitrálních a chomáčkovitých nervových buněk (obr. 3). Axony těchto buněk předávají informaci přes laterální olfaktorické ústrojí a do několika oblastí v mozku. Glomeruly jsou mezi sebou propojeny intrabulbulární sítí, která propojuje mediální a laterální hemisféry olfaktorického bulbu (Vosshall, 2003). Studie Rubina a Katze (1999) ukázaly, že jeden odorant je schopen aktivovat jeden soubor glomerulů a jiné odoranty aktivují více souborů najednou. Každý pach tedy aktivuje specifickou kombinaci glomerulů.

Hluboko v OB se nachází granulórní buňky, které nemají axony a jejich dendrity se spojují s dendrity mitrálních buněk ve vrstvách blíže povrchu. Každá mitrální buňka má dendrit pouze v jednom glomerulu, což by znamenalo, že reakce mitrální buňky je dominantní činností glomerulu (Gottfried, 2010). Pozorování sousedících mitrálních buněk ukázalo, že jsou aktivovány odoranty ze stejné skupiny, jako jsou například kyseliny či ketony. To by naznačovalo, že mitrální buňky jsou rozděleny prostorově podle druhu odorantů, které je aktivují (Mackay-Sim et Royet, 2006).

Mnohá z těchto spojení mezi OB a primární olfaktorickou kůrou jsou obousměrná. To by svědčilo o tom, že OB není jen pasivní kanál pro smyslové informace, které přeměňuje a vyostřuje, jak to dělá intrabulbulární síť. OB působí zřejmě i jako filtr, který odpovídá přirozenému chování spojenému s potravou, rozmnožováním či predátory (Mackay-Sim et Royet, 2006).



Obrázek 3.: Vstup axonů olfaktorických neuronů do olfaktorického bulbu a glomerulů (Firestein, 2001).

### 3.1.2.3 Čichová kůra

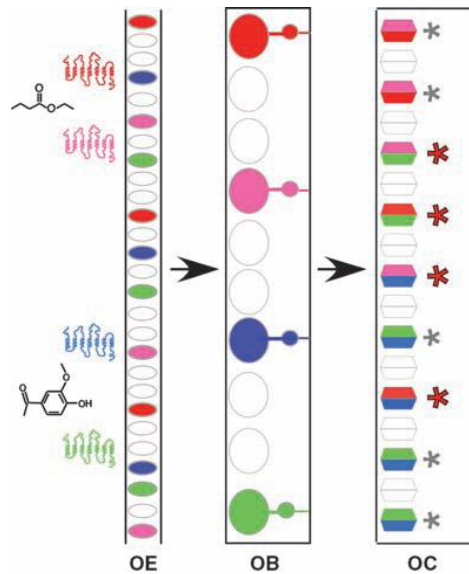
Z olfaktorického bulbu dále vedou neurony vzruch do čichové kůry (olfaktorický kortex) bez přepojení v thalamu. V olfaktorickém kortexu vzniká pachový vjem od různých olfaktorických neuronů (Zou et Buck, 2006).

Olfaktorický kortex se skládá z piriformní a laterální entorhinální kůry, předního čichového jádra, čichového výběžku, periamygdaloidní kůry, kortikálního amygdaloidního jádra, laterálního olfaktorického ústrojí a dorzálního hipokampického rudimentu (Mackay-Sim et Royet, 2006).

Piriformní kůra je trojvrstvá struktura ležící ventrálně na povrchu mozkové hemisféry. Přední a zadní poloviny piriformní kůry se morfologicky liší a mohou mít i odlišnou funkci (Zou et al., 2001). Do první vrstvy piriformní kůry vstupují axony mitrálních buněk, které tvoří synapse s apikálními dendrity pyramidových neuronů. Těla pyramidových neuronů se dále nacházejí v druhé a třetí vrstvě piriformní kůry. Axony chomáčkovitých buněk vstupují pouze do předních oblastí piriformní kůry (Settler et Axel, 2009). U lidí společně s orbitofrontální kůrou je její funkce pravděpodobně spojena s rozeznáváním pachů a jejich zapamatováním. U potkanů je piriformní kůra zapojena do asociativního učení a paměti. Ostatní části temporálního laloku jako hipokampus, parahipokampální oblasti a perirhinální kůry jsou aktivovány při rozlišování pachů a kontaktu s již známými pachy. Zatím nebylo objasněno, jak se tyto struktury podílejí na čichové paměti (Mackay-Sim et Royet, 2006).

Orbitofrontální kůra a amygdala se zapojují při reakci na příjemné a nepříjemné pachy. Vysoce averzivní pachy aktivují levou stranu orbitofrontální kůry a amygdalu bilaterálně, zatímco méně averzivní a příjemné pachy aktivují pouze levou část orbitofrontální kůry. Amygdala zprostředkovává negativní a pozitivní emoce. To by mohlo naznačovat, že odezva na nepříjemné či příjemné pachy je spíše emoční než smyslová (Mackay-Sim et Royet, 2006).

Zou a Buck (2006) navrhli, že oddělené kortikální neurony mohou integrovat signály z olfaktorických neuronů detekujících stejný odorant. Kortikální neurony pro svou aktivaci potřebovaly shodný vstup alespoň dvou olfaktorických neuronů. Při porovnání takto vytvořené olfaktorické mapy bylo ale zjištěno, že se neshoduje s tou v OB. Mísení dvou odorantů totiž může aktivovat další kortikální neurony (až o 30 %), aniž by byly stimulovány látkami obsaženými v odorantech. To by mohlo vysvětlit, proč již známé pachové látky mozek vyloží jako nový pachový vjem.



Obrázek 4.: Odezva olfaktorického systému na dva odlišné pachy. Vstupy odlišných olfaktorických receptorů (OR) jsou segregovány v olfaktorickém epitelu (OE) a olfaktorickém bulbu (OB). V olfaktorickém kortexu (OC) jsou tyto vstupy kombinovány ve skupinách oddělených neuronů. Mísení dvou odorantů vyvolá vstup dalších párů OR, ty stimulují OC neurony, které nebyly aktivovány odoranty (Zou et Buck, 2006).

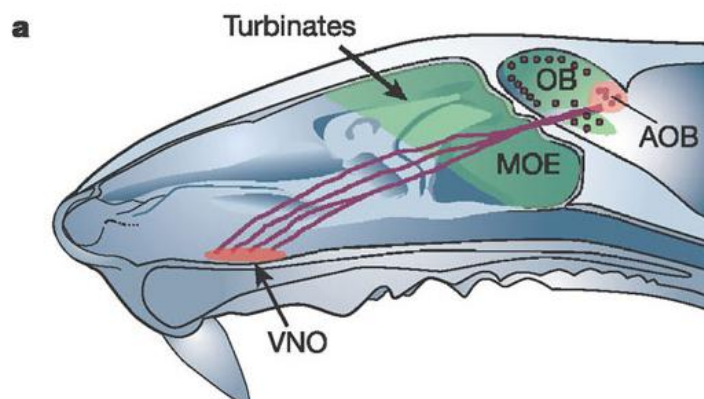
### 3.1.3 Vomeronazální orgán

Vomeronazální orgán (VNO), známý také jako Jakobsonův orgán, je chemoreceptorový tubulární orgán uzavřený v chrupavčité kapsli a oddělený od olfaktorické sliznice ve ventrální části dutiny nosní na obou stranách spodní části nosní přepážky (obr. 5). Jeho kaudální část je uzavřená a kraniální část ústí do řezákového kanálu, tím je VNO spojen s nosní dutinou. Na obou stranách nosní přepážky jsou dva půlměsíčitě otvory. Velikost VNO je u psů variabilní podle délky splanchokrania. VNO hraje důležitou roli při pachové komunikaci. Při chemické signalizaci hrají důležitou roli feromony, které jsou zpracovávány právě ve VNO (Yilmaz et al., 2008). VNO reaguje na stálé podněty, což vede k aktivaci hypotalamu prostřednictvím přídatného olfaktorického bulbu a amygdaly. Inervovaná část hypotalamu potom reguluje reprodukční, obranné a pátrací chování, stejně jako neuroendokrinní sekreci (Keverne, 1999).

Sliznice oproti hlavní olfaktorické sliznici není přímo vystavena proudění vzduchu (Mucignat-Caretta, 2010). Skládá se z povrchové vrstvy tvořené prodlouženými základními buňkami, vrstvou prodloužených podpůrných buněk, několika vrstvami bipolárních buněk a málopočetnými bazálními buňkami, které jsou rozptýlené mezi bipolárními buňkami a tvoří

zřetelné vrstvy (Vaccarezza et al., 1981). Dále je sliznice opatřena čerpacím mechanismem pro oplachování sekretem (Mucignat-Caretta, 2010).

Vomeronazální sensorické neurony mají na svém povrchu řasinky (microvilli) na rozdíl od hlavní olfaktorické sliznice, která obsahuje cilie. Tyto řasinky obsahují dva od sebe odlišné druhy receptorů, které se liší i od pachových receptorů v hlavním olfaktorickém epitelu (Keverne, 1999). Jsou to genové rodiny V1R a V2R. Tyto receptory jsou spřažené s G - proteiny (GPCR) a liší se ve své podjednotce. V tomto případě jsou buď exprimovány proteiny G $\alpha$ 2 v apikální vrstvě, nebo proteiny G $\alpha$ o v bazální vrstvě (Berghard et Buck, 1996). Axony vomeronazálních sensorických neuronů vstupují přímo do mozku bez přepojení v thalamu. Axony z apikální vrstvy vstupují do přední části přídatného olfaktorického bulbu a z bazální vrstvy vstupují do jeho zadní části (Mohedano – Moriano et al., 2007). Přídatný olfaktorický bulbus je zakotven v dorzální části hlavního olfaktorického bulbu a vzniká v něm první centrální integrace vomeronazálních vstupů. Axony VNO orgánu tvoří synapse s dendrity mitrálních a chomáčkovitých buněk v glomerulech (Mucignat-Caretta, 2010). Podnět pak dále pokračuje do specifické části amygdaly (Mohedano – Moriano et al., 2007). Amygdala vstupuje zpátky do přídatného olfaktorického bulbu a granulárních buněk přes terminalis stria. Axony bad nucleus terminalis stria vstupují do vrstvy mitrálních buněk přídatného olfaktorického bulbu. V amygdale se vstupy z obou olfaktorických bulbů sbíhají do jednotlivých neuronů, ty spojují informace zpracované hlavním a přídatným čichovým systémem. Spolupráce těchto dvou systémů se uplatňuje při chování, které je vyvolané odoranty predátora. Amygdala se zásadně podílí na společenském, sexuálním, rodičovském a agresivním chování (Mucignat-Caretta, 2010).



Obrázek 5.: Uložení VNO a jeho přepojení do přídatného olfaktorického bulbu (AOB). Uložení hlavní olfaktorické sliznice (MOE) a olfaktorického bulbu (OB), (Firestein, 2001).



### 3.1.4 Septální orgán

Septální orgán je malý ostrůvek olfaktorického neuroepitelu na ventrálním základu obou nosních přepážek, který dosahuje přibližně velikosti 1 % hlavního olfaktorického epitelu. Septální orgán je v mnoha ohledech podobný hlavnímu olfaktorickému epitelu. Obsahuje olfaktorické senzory, podpůrné buňky a Bowmanovy žlázy. Olfaktorické neurony obou systémů vykazují podobné reakce na odoranty. Ty jsou zprostředkovány pomocí G – proteinu a cAMP. Rozdíl mezi septálním orgánem a hlavním olfaktorickým epitelem je v délce dendritů, velikosti dendritických knoflíků a v rozvrstvení olfaktorických neuronů. Septální orgán obsahuje kratší dendrity s většími dendritickými knoflíky a menší počet vrstev olfaktorických neuronů než hlavní olfaktorická sliznice (Ma et al. 2003).

I když byl septální orgán pozorován u mnoha savců, zatím nebyla jeho funkce plně objasněna. Podle výzkumu prováděného na myších a krysách bylo zjištěno, že hlavní receptory v septálním orgánu myši jsou velmi podobné jako u krys, což naznačuje, že má u různých druhů společnou funkci. Závěry výzkumu podporují hypotézu, že v septálním orgánu jedna buňka exprimuje jeden receptorový gen (Tian et Ma, 2004).

Bylo zjištěno, že největší septální receptorové geny jsou sdílené s hlavním olfaktorickým epitelem a některé receptory jsou v neobvykle vysoké hustotě, což by naznačovalo dvě možné funkce septálního orgánu. Jelikož je septální orgán citlivý na některé ligandy, je jeho funkce možná spojena právě s nimi. Další možností je, že může hrát různé role při detekci zápachu a jeho rozlišení, protože neurony septálního orgánu mohou odpovídat na mnoho odorantů s výraznou chemickou strukturou (Tian et Ma, 2004). Dalšími autory bylo navrženo, že septální orgán může mít varovnou funkci při vnímání pachů z prostředí při klidném dýchání, když proud vzduchu nedosáhne hlavního olfaktorického epitelu. To však bylo umožněno díky poloze septálního orgánu (Ma et al. 2003). Tuto teorii podporuje hypotéza, že septální orgán může být k některým odorantům citlivější než hlavní olfaktorický epitel (Marshall et Maruniak, 1986). Wysocki et al. (1980) navrhl teorii, že septální orgán může hrát roli při vnímání sloučenin nízké volatility. Sloučenina s nízkou volatilitou se dostane jak k septálnímu orgánu, tak vomeronazálnímu orgánu, ale ne k hlavnímu olfaktorickému epitelu.

### 3.1.5 Gruenbergerovo ganglium

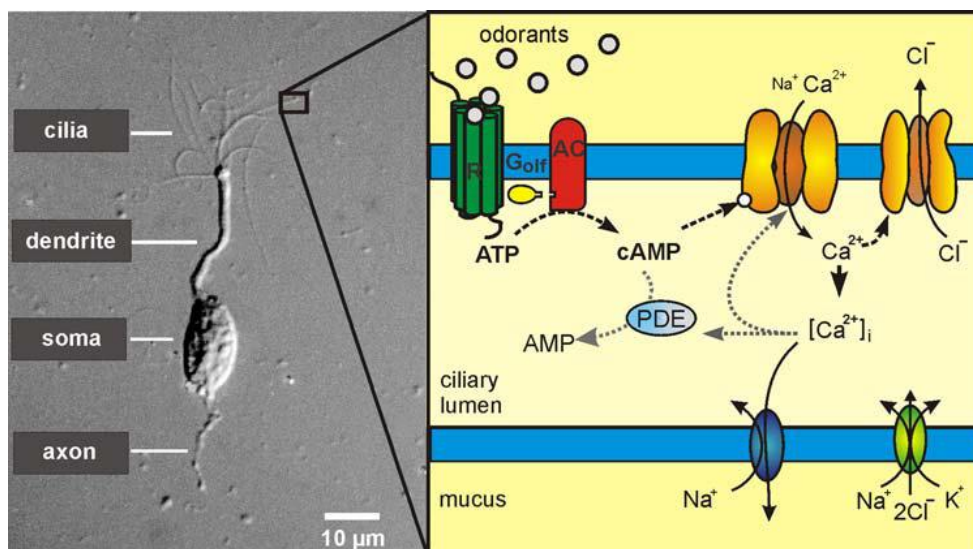
Gruenbergerovo ganglium se nachází po obou stranách přední části nosní přepážky. Bylo popsáno v roce 1973 Gruenbergem a původně bylo považováno za součást terminálního nervu. Poslední studie ukázaly, že by se mohlo jednat o chemosenzorický orgán, který by sloužil k vnímání chemických sociálních signálů v raném postnatálním vývoji (Breer et al., 2006).

### 3.1.6 Přenos signálu v olfaktorickém systému

Olfaktorické receptory patří do skupiny receptorů spřažených s G – proteiny (GPCR). Jejich sekvence obsahují sedm segmentů s hydrofobními aminokyselinovými rezidui, které tvoří strukturu šroubovice zanořené do lipidové dvojvrstvy v membráně. Segmenty hydrofilních reziduí tvoří smyčky, které jsou ve vodě stabilní a propojují šroubovice (Zarzo, 2007). Šroubovice obsahují vazebné místo pro odoranty na extracelulární straně a vazebné místo na cytoplazmatické doméně, kde se párují s heterotrimerickými G – proteiny, které se skládají ze tří podjednotek. Po navázání odorantu olfaktorické receptory podstoupí určité strukturální změny, ty aktivují olfaktoricky – specifický subtyp G – proteinu ( $G_{\text{olf}}$ ), který postupně aktivuje adenylátcyklázu. Tento enzym přemění intracelulární adenosin trifosfát (ATP) na cyklický adenosin monosfát (cAMP). V olfaktorických neuronech se cAMP váže na intracelulární část iontového kanálu (CNG), který umožní vést např.  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$ . Neaktivní olfaktorické receptory udržují klidové napětí. Když jsou CNG kanály otevřené, vliv  $\text{Na}^+$  a  $\text{Ca}^{2+}$  způsobí vznik akčního potenciálu, ten se pak dál šíří axony. Tyto axony pak procházejí přes řešetnou ploténku do předního mozku, kde tvoří synapse s neurony druhého řádu v olfaktorickém bulbu (obr. 6), (Firestein, 2001).

Druhý posel kaskády enzymů umožňuje zesílení a integraci vazby odorantu. Jeden membránový receptor může totiž aktivovat desítky G proteinů a každý protein aktivuje cyklázu produkce molekul cAMP, což znamená produkci asi 1000 molekul cAMP. Další zesilovací mechanismus olfaktorických neuronů je vstup iontů vápníku přes CNG kanál. Ty jsou schopny aktivovat další iontové kanály, které jsou propustné pro záporně nabitě ionty chlóru. Většinou ionty  $\text{Cl}^-$  vstupují do takto otevřeného kanálu, ale v olfaktorických neuronech je udržována neobvykle vysoká intracelulární koncentrace  $\text{Cl}^-$ , takže když jsou tyto další iontové kanály aktivovány, ionty  $\text{Cl}^-$  jsou odplavovány (Firestein, 2001).

Vápníkové ionty snižují citlivost na cAMP, proto musí být stimulace odorantem dostatečně silná, aby se kanály otevřely. To umožňuje olfaktorickým neuronům regulovat svoji citlivost. K tomu jim pomáhá i nedávno objevený RGS (regulátor signalizace G - proteinu), který pravděpodobně působí na adenylátcyklázu a snižuje její aktivitu (Firestein, 2001).



Obrázek 6.: Vlevo: mikrofotografie olfaktorického senzorkého neuronu. Vpravo: přenos signálu v olfaktorickém systému (Frings, 2009).

### 3.2 Objev a charakterizace olfaktorických receptorů

Buck a Axel (1991) objevili a charakterizovali obrovskou rodinu transmembránových proteinů nacházející se v hlavním olfaktorickém epitelu, které vytvářejí olfaktorický subgenom. Ten se může rozdělit na aktivní a inaktivní geny (pseudogeny). Přibližně 60% lidského genomu tvoří pseudogeny (Firestein, 2001). Quignon et al. (2003) uvádí, že subgenom člověka obsahuje 63 % pseudogenů, u psa 18 % a u myši 20%. Obsah pseudogenů psa a myši je podobný, ale v porovnání s lidmi je zde velký rozdíl. To bylo dříve pokládáno jako jedno z možných vysvětlení rozdílu mezi makrosomatickými a mikrosomatickými druhy savců. Toto rozdělení je dnes již zastaralé a pracuje na základě velikosti olfaktorického systému, s kterým se spojovaly i jedinečné čichové schopnosti. Toto rozdělení je však zavádějící. Například kvalita čichových schopností myši a potkanů je srovnatelná se psy, ale velikost olfaktorického systému je rozdílná. To platí i při porovnání s lidmi, jenže lidé a primáti se řadí mezi mikrosomatické savce (Goldblatt et al., 2009). Spekulovalo se, že pro mikrosomatické savce není čich až tak důležitý. Některé studie však ukázaly, že mikrosomatictí savci mohou detekovat některé pachy daleko lépe než makrosomatictí (Laska

et al., 2000). Jednalo se zejména o pachy spojené s potravinami běžnými pro tyto savce. Například mikrosomatické opice vykazují nižší práh pro pachy ovoce na rozdíl od šelem, což by podpořilo roli přirozeného výběru při určování prahové hodnoty specifických pachů (Dominy et al., 2001). To potvrzuje i studie, kterou provedl Laska et al. (2005) na potkanech. Zjistil, že potkani byli schopni rozlišit koncentrace mezi 0,04 a 0,10 ppt ( $10^{-12}$ ) pro 2, 4, 5 – trimethylthiazol, což je zápach spojený s liščními výkaly. Liška je častým predátorem potkanů. Když se tomuto pachu vystavily jiné druhy, které nejsou liškami ohroženy, nebyly schopni rozlišit tento pach v tak malých dávkách.

### 3.2.1 Olfaktorické receptorové proteiny

Nosní dutina obsahuje přibližně 400 olfaktorických receptorových proteinů u lidí a asi 1000 u psů (Zarzo, 2007). Sell (2006) uvádí, že většina savců používá 700 až 800 různých olfaktorických receptorových proteinů. Lidé používají přibližně polovinu tohoto počtu. Receptory jsou kombinačně užívány k detekci odorantů a k jejich kódování (Malnic et al., 1999). Databáze olfaktorického receptoru obsahuje soubor 45 ligandů, které rozeznávají cílové odoranty a poté aktivují olfaktorické receptory (Malnic et al., 2004). Tyto receptory se nachází na cílích olfaktorických neuronů, proto jejich selektivní odstranění způsobí ztrátu čichu. Cilie jsou místem olfaktorického transdukčního signálu. Proteinové receptory určují, které kombinace olfaktorických receptorů budou reagovat (Frings, 2009). Malnic et al. (1999) svými pokusy na myších zjistil, že olfaktorické receptory jsou schopny reagovat na více odorantů a jeden odorant vyvolá reakci více receptorů. Ma a Sheperd (2000) objevili reakci 40 – 90 různých receptorů na jeden odorant. Malnic et al. (1999) zjistil, že různé odoranty mohou být rozeznávány různými kombinacemi olfaktorických receptorů, takže čich pracuje kombinatorně. To vysvětluje, proč jsou psi, ale i jiní savci schopni vnímat tolik pachů. Také bylo prokázáno, že odoranty mohou fungovat i jako agonisté a antagonisté. To znamená, že dva pachy se mohou vyblokovat a jeden z nich pak není cítit (Zarzo, 2007). Tento jev se nazývá olfaktorický antagonismus a byl prokázán u oblastí olfaktorických receptorů OR17 – 4 (Spehr et al., 2003), u potkana na OR17 (Araneda et al., 2004), mOR – EG (Oka et al., 2004), OR1G1 (Sanz et al., 2005) a ORS86 (Shirokova et al., 2005). Tato dvojí funkce odorantů působící na olfaktorické receptory jako agonista a antagonisty, naznačuje nový aspekt v kódování směsí odorantů (Oka et al., 2004).

Další nevyřešené otázky se týkají vlivu intenzity odorantu na receptorové kódování. Studie prováděné na toto téma ukázaly, že repertoár olfaktorických neuronů je rozmanitější

při vyšších koncentracích. Takže některé neurony nereagují na pachy v malé koncentraci. U některých pachů malá koncentrace vyvolá jiný pachový vjem než vysoká koncentrace, tak je tomu například u kافrového pachu (Rubin et Katz, 1999).

### **3.2.1.1 Klíčová rezidua aminokyselin v olfaktorických receptorech**

Od objevu olfaktorických receptorů se několik studií pokusilo analyzovat sekvence olfaktorických receptorů rozeznávajících rezidua s potencionální rolí rozpoznávání odorantů (Singer et al., 1995). Při použití rodopsinové šablony byla nalezena nejvíce variabilní rezidua, která měla tendenci se orientovat dovnitř receptorů a hydrofobní rezidua směřovala na rozhraní lipidů a proteinů. To pomohlo určit 17 vysoce variabilních reziduí, která by mohla hrát velkou roli při diskriminaci pachů (Pilpel et Lancet, 1999). Očekává se, že funkční rezidua jsou spíše variabilní v rovnocenné pozici paralogních genových sekvencí olfaktorických receptorů a zároveň jsou zachována v ortologních genech olfaktorických receptorů (Kondo et al., 2002).

Analýzy myších a lidských sekvencí proteinů olfaktorických receptorů vedly k identifikaci 22 sekvenčních pozic, které by se pravděpodobně mohly podílet při navazování odorantů receptory. Tyto sekvence byly zachovány u lidí i myši více v ortologních genech a méně v paralogních. Většina těchto reziduí koresponduje s jinými kontaktními místy s ligandy u jiných GPCR (Singer et Shepherd, 1994).

Katada et al. (2005) objevil oblast 26 aminokyselin, které váží odoranty. Po bližší analýze se prokázalo, že 9 aminokyselin v TM3, TM5 a TM6 bylo zapojeno do rozeznávání odorantů v oblasti mOR – EG. Tyto výsledky by poskytovaly důkaz o funkčnosti odotopové teorie (Zarzo, 2007).

### **3.2.1.2 Strukturální změny v olfaktorickém receptoru během navázání odorantu**

Podrobnosti konformačních změn během navazování odorantu receptorem nebyly zatím objasněny. Je znám pouze mechanismus ostatních GPCR, který by se mohl uplatňovat i zde. Studie Scheera et al. (2000) a Gáborika et al. (2003) uvádějí, že A1B – adrenergní receptory a AT1A – angiotensní receptory hrají klíčovou roli při aktivaci GPCR. Přestože podrobnosti o aktivaci G – proteinů zatím nejsou úplně jasné, je pravděpodobné, že pohyb TM šroubovice je po navázání ligandu vystavena tzv. DRY motivu v intracelulární oblasti a tím umožňuje vazbu konkrétního podtypu G – proteinu (Zarzo, 2007). DRY motiv je typická oblast se sedmi transmembránovými úseky v druhé celulární smyčce obsahující

charakteristický motiv Asp – Arg – Tyr (Lagane et. al., 2005). Na základě této myšlenky Vaidehi et al. (2002) navrhl strukturální model a potenciaální vazebné místo s několika GPCR. Bylo navrženo, že po navázání ligandu v oblasti OR17 u potkana, by se mohla třetí šroubovice přemístit v cytoplazmatickém směru a tímto pohybem odhalit DRY motiv intracelulární oblasti a zahájit transdukční mechanismus.

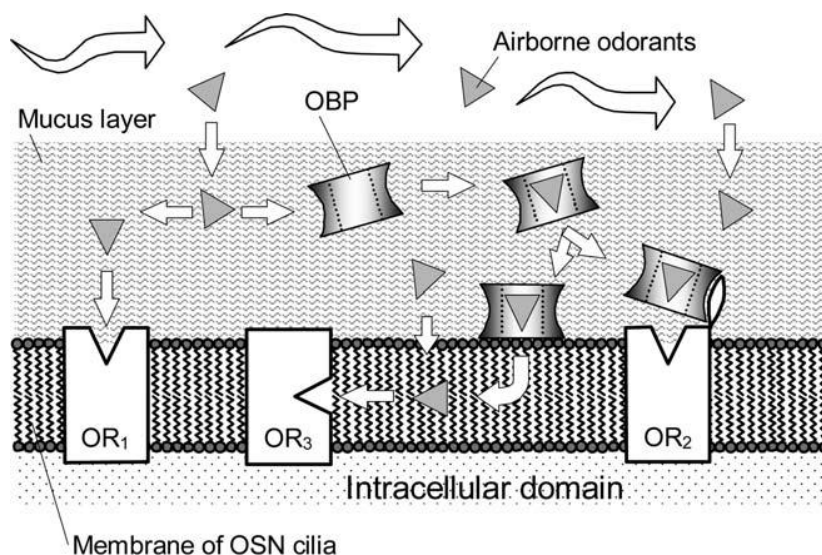
### **3.2.2 Charakterizace proteinů vázajících odoranty**

Cilie olfaktorických neuronů, jak již bylo zmíněno, jsou zanořené do tenké vrstvy mukózy. Ta obsahuje vodu, anionty a především proteiny vázající odoranty (odorant – binding protein). Tyto proteiny nejspíše napomáhají dopravovat lipofilní molekuly pachu k jednotlivým receptorům. Také se mohou podílet na odstraňování molekul pachu po aktivaci receptorů. Existují poznatky svědčící pro možnost, že pach s olfaktorickými receptory nereagují přímo, ale v komplexu s vazebnými proteiny (Bianchet et al., 1996), ačkoliv bylo prokázáno, že aktivace olfaktorických receptorů není přímo závislá na přítomnosti proteinů vázajících odoranty (OBPs). Podrobnosti o funkci OBPs prozatím nebyly plně objasněny (Malnic et al., 1999).

Bylo zjištěno, že existuje více subtypů OBPs, které se vyskytují současně u stejných živočišných druhů (Felicoli et al. 1993). Felicoli et al. (1993) identifikoval osm druhů OBPs u dikobraza obecného. Tento počet se pravděpodobně vyskytuje u většiny savců. U potkanů bylo objeveno několik typů OBPs reagujících na jiné chemické sloučeniny. OBP – 1 váže především heterocyklické sloučeniny, OBP – 2 váže dlouhé řetězce alifatických aldehydů a karboxylové skupiny. Z toho vyplývá, že se většina sloučenin váže na jeden subtyp OBPs. Jednotlivé OBPs vystavují charakteristicky ligand - vazebný profil, který interaguje s odlišnými podmožinami exogenních organických sloučenin. Podobné uspořádání OBPs bylo pozorováno i u lidí. Tyto výsledky by naznačovaly, že OBPs pracují spíše jako selektivní filtr v předvolbě odorantu než jako nosiči hydrofobních sloučenin (Löbel et al. 1998).

Pokud je odorant dostatečně hydrofilní, je schopen dostat se k olfaktorickému epitelu bez pomoci OBPs, protože se snadno rozpouští ve vrstvě hlenu. Zatímco vysoce hydrofobní odoranty nejsou schopny projít skrz vrstvu mukózy bez pomoci OBPs. Existují dvě hypotézy o přepravě odorantů pomocí OBPs. První se domnívá, že odoranty jsou přepravovány na lipidovou dvojvrstvu membrány a pak se šíří příčně do specifických míst v olfaktorických receptorech. Druhá hypotéza tvrdí, že OBPs, které obsahují navázaný odorant, jsou schopny komunikovat s receptory v místě extracelulární smyčky a tím urychlit transport OBPs na

vazebné místo. Tyto druhy dopravy odorantů pomocí OBPs, by se mohly uplatnit u částečně hydrofilních a hydrofobních molekul. Druh dopravy by mohl záviset na koncentraci dané látky. Role OBPs by potom byla klíčová především při nízkých koncentracích pachových látek (Matarazzo et al., 2002).



Obrázek 7.: Teoretický mechanismus transportu odorantů k olfaktorickým receptorům (OR), (Zarzo, 2007)

### 3.3 Rané teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické recepce

#### 3.3.1 Odoranty

Odorant je chemická sloučenina, která je schopna vyvolat reakci olfaktorických receptorů. Odoranty sdílejí určité molekulární vlastnosti. Jsou volatilní (těkavé), hydrofobní, lipofilní a mají hmotnost menší než 300 Daltonů. Tato kritéria by mohla být důležitá z biologického hlediska, protože molekula odorantu musí být schopna projít membránou v receptoru. Volatilita rychle klesá s velikostí molekuly. Netěkavé molekuly se hůře dostávají do kontaktu s olfaktorickými receptory, což může být příčina, proč jsou některé velké molekuly odorantů bez zápachu (např. některé steroidy). Také byly zaznamenány častější anosmie na pachy skládajících se z těchto větších molekul. Z toho by se dalo usuzovat, že receptory nemohou pojmout molekuly větší než je určitá velikost a tato velikost by mohla být geneticky určena (Turin et Yoshii, 2003).

### 3.3.2 Teorie tvaru molekuly

Po objevu interakce mezi enzymy a substráty na základě molekulárního rozeznávání mezi proteinovým receptorem a ligandy, byla vědci navržena teorie, že by se tento mechanismus mohl uplatnit i v olfaktorice. Molekula určitého tvaru by odpovídala místu v receptoru jako klíč do zámku, což by vyvolalo zpracování signálu mozkiem (Zarzo, 2007). Jako první tuto teorii navrhl R. W. Moncrieff v roce 1951 a uvedl, že pach bude cítit, pokud bude jeho molekula stanoveného tvaru a ten bude zapadat do určitého místa v receptoru. Podobné myšlenky také vyjádřili J. Timmermans a L. J. Mullins. L. J. Mullins, navrhl, že stále pachové molekuly více stimulují receptory než molekuly nestálé.

J. E. Amoore se jako první pokusil experimentálně dokázat tuto teorii. Amoore (1963) prosazoval myšlenku, že tvar molekuly odorantu je silně spjat s jeho charakterem. Porovnal velké množství molekulárních struktur odorantů a našel podobnosti mezi tvary odorantů a jejich pachem. Také zkoumal odoranty s výraznou strukturou molekuly jako např.: éterický, kafrový a pižmový pach a zjistil, že tyto pachy jsou závislé na velikosti jejich molekuly, zatímco u mátového a květinového pachu je důležitější jejich tvar (Klopping, 1971).

J. E. Amoore dále studoval případy částečných anosmií. V té době byly popsány anosmie pro N – butylmercaptan, kyanovodík, izomáselnou kyselinu, aminy, pižmovou vůni, 1,8 – cineol atd. Spekulovalo se o tom, že anosmie je způsobena vadou určitého detektoru odorantů. Tuto spekulaci podpořil fakt, že některé anosmie mohou být dědičné. J. E. Amoore navrhoval, že počet primárních pachů, které dokážeme rozlišit, lze odhadnout pomocí komplexního výzkumu konkrétních anosmií. Bylo potřeba zjistit, které specifické receptory jsou u jedinců s anosmií inaktivní. (Zarzo, 2007).

### 3.3.3 Vibrační teorie

Spektroskopické studie prováděné roku 1930 G. M. Dysonem odhalily souvislost mezi jednotlivými pachy a vibračními frekvencemi molekul. Díky tomuto objevu byla navržena teorie, že čichové orgány jsou schopny nějakým způsobem detekovat molekulární vibrace a tím rozlišovat jednotlivé pachy. Dyson navrhl, že vibrační frekvence by měly být přiřazeny k jednotlivým Ramanovým frekvencím v rozsahu  $1400 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  (Klopping, 1971).

Tato teorie byla později upravena R. H. Wrightem (1954), který uvedl, že Ramanovy frekvence by mohly souviset s konkrétními funkčními skupinami jako OH, SH, CO atd. Tvrdil, že detekce molekulární vibrace musí být mechanická a vibrace může být detekována



pouze při tělesné teplotě. To by znamenalo, že detekovatelné vibrace by musely mít rozsah přibližně pod  $500\text{ cm}^{-1}$ . Nicméně mnoho anorganických molekul, které mají výrazný pach, se pohybuje v rozpětí  $700 - 3500\text{ cm}^{-1}$  (Turin, 1996). Z toho vyplývá, že pod hranicí  $500\text{ cm}^{-1}$  nelze určovat pachy (Klopping, 1971).

Turin (1996) na podporu této teorie udává příklad boranů, jejichž B – H vazby mají úsek, který se překrývá s frekvenčním rozsahem s thioley, proto by měly být podobně cítit. Porovnával pachy boranů a thiolů pomocí dekaberonu<sup>2</sup>, který páchne jako vařená cibule, což je typický pach pro SH. Tento pach byl popsán i jako čokoládový (čokoláda obsahuje některé thioley). Tento případ by podporoval vibrační teorii. Tuto skutečnost lze interpretovat i jinak, třeba tím, že borany ve skutečnosti jako síra nepáchnou, nebo že podobnost jejich pachů je pouze náhodná. BH a SH aktivují stejný odotopový receptor i když mají odlišný tvar.

Dalším zajímavým případem jsou homonukleární dvouatomové plyny (např.:  $\text{H}_2$ ,  $\text{N}_2$  a  $\text{O}_2$ ). Jejich molekuly se skládají ze dvou stejných atomů a díky jejich symetrii jsou bez vibrace. To by znamenalo, že jsou tyto plyny bez zápachu, což je do jisté míry pravda. Výjimku ale tvoří halogenové plyny (např.:  $\text{Cl}_2$ ). Ten má velmi nepříjemný chlórový zápach (Turin, 1996).

Franco et al. (2011) prováděla pokusy na octomilkách obecných (*Drosophila melanogaster*). Zabudovala atomy deuteria do molekuly acetofenonu, což nezpůsobilo výraznou molekulární změnu tvaru, velikost atomu, nebo délku vazby, ale zdvojnásobila se vodíková hmotnost. To ovlivnilo vibrační mód molekuly tak, že vibruje pomaleji. Kdyby diskriminace molekul odorantu fungovala pouze na tvaru molekuly, tak by mušky neměly být schopny rozeznat molekuly s deuteriem od těch, které ho neobsahují. Acetofenon je pro mušky velice atraktivní látka, ale když vědci nahradili 3 atomy vodíku za deuterium, tak byla tato molekula pro mušky méně atraktivní a úplné nahrazení atomů vodíku deuteriem způsobovalo averzi. To znamená, že octomilka obecná je schopna rozlišit molekulu acetofenonu obsahující vodík od acetofenonu obsahující deuterium.

V dalším pokusu Franco et al. (2011) naučila mušky pomocí elektrického šoku, aby se acetofenonu obsahujícímu deuterium vyhýbaly. Pak muškám předložila molekuly nitrilů, které mají vibrační spektrum stejné jako molekuly s deuteriem. Tímto se změnil tvar molekuly, ale ne vibrační spektrum. To by znamenalo, že by se mušky měly v souladu s vibrační teorií nitrilům vyhýbat. Část mušek se těmito molekulám vyhýbala a druhá část ne. Tato skutečnost by mohla být vysvětlena tím, že zde hrály roli nečistoty okolního vzduchu, špatná koncentrace látky nebo nepříliš vhodný výběr deuteria. To totiž mění nejen vibrace, ale i vlastnosti látek, například u acetofenonu bod tání a bod varu.

Podobná studie byla provedena i u lidí. První látka byla dimethyl sulfid, který páchne podobně jako zelí a jeho plně deuterovaná obdoba (dimetylsulfid – d6) voněl spíše po lanýžích (Turin et Yoshii, 2003). Stejně to bylo i v případě acetofenonu a acetofenonu – d8. Acetofenon voněl spíše po toluenu, zatímco acetofenon – d8 voněl spíše ovocně či hořko – mandlově (Turin, 1996).

Jedním z důvodů zpochybnění této teorie, je fakt, že nedokáže vysvětlit skutečnost, proč některé enantiometry (optické izomery) produkují různé pachy i když mají shodná svá vibrační spektra (Zarzo, 2007). Brookes et al. (2008) uvádí, že je tato skutečnost možná díky jejich chiralitě. Enantiometry existují ve dvou prostorových isomerech, takže jejich vzájemný vztah je totožný se vztahem levé a pravé ruky. Proto by tyto sloučeniny měly být cítit z pravé a levé strany jinak.

Další důvodem, proč byla tato teorie před dvaceti lety zpochybněna, je, že zatím nebyl nalezen žádný přijatelný mechanismus na bázi bílkovinné spektroskopie. Tuto interakci byla schopna vysvětlit až teorie spektroskopie nepružného elektronového tunelování. Tato teorie je schopna objasnit, jak by mohl pracovat mechanismus umožňující bílkovinám působit jako vibrační spektroskop (Turin et Yoshii, 2003).

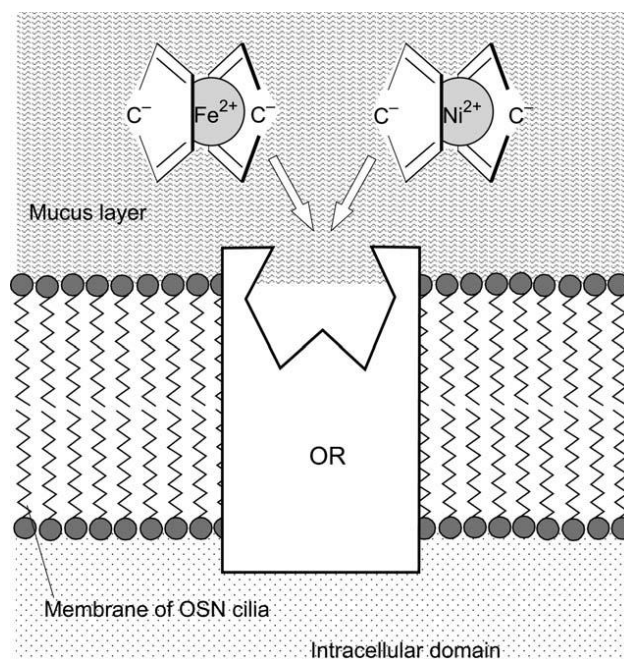
## **3.4 Moderní teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické receptce**

### **3.4.1 Odotopová teorie**

Na teorii tvaru molekuly navazuje teorie odotopová, ve které byla navržena možnost, že receptor reaguje na více než jeden odorant. To by naznačovalo, že receptory nedetekují celou molekulu, ale dílčí strukturální rysy – odotopy (Turin et Yoshii, 2003). Počet a charakter daných odotopů zatím není znám (Turin, 2001). Podle této teorie by receptory pracovaly v jakémsi kombinačním (binárním) režimu. Kombinace odotopů a základního schématu měření intenzity reakce s každým receptorem, umožňuje vytvořit rozsáhlejší vnímání pachu. Při velkém počtu receptorů jejich kombinační vlastnosti dosáhnou obrovských rozměrů (Turin et Yoshii, 2003). Lancet et al. (1993) proto navrhl možnost přítomnosti "podřízených" odotopů a jejich variability v kombinaci s energetickými vazbami. Za předpokladu nízké afinity vazby odorantů můžeme dojít k závěru, že je potřeba 1000 – 3000 receptorů pro rozeznání pachů. To by souhlasilo s aktuálními odhady. Hlavním důkazem

této teorie je, že známé subtypy receptorů reagují více než na jeden odorant. Když Turin a Yoshii (2003) při svém výzkumu nahradili atom uhlíku křemíkem, tak se zachovaly vazebné úhly, mírně se zvýšila délka vazby a modifikoval se parciální náboj. Tyto malé strukturální změny vedly ke změnám pachu. To by ale mohlo být vysvětleno rozdílným parciálním nábojem a jinou hmotností molekuly, protože tyto aspekty mění i její vibrační spektrum.

Tuto teorii vyvrací případ alkoholů, které mají podobný tvar molekuly s thioley, ale jejich pach je velmi odlišný. To platí při jakékoliv koncentraci těchto látek (Turin et Yoshii, 2003). Stejně je to i v případě acetonitrilu a methyl – isonitrilu. Mají podobnou strukturu, ale jsou cítit odlišně. Acetonitril má jemnou éterickou vůni a methyl – isonitril má výrazný nepříjemný pach (Klopping, 1971). Případ benzaldehydu a benzonitrilu, které mají podobnou vůni, ale naprosto odlišnou strukturu a patří i do jiných skupin, také vyvrací tuto teorii. To samé platí i v případě agrunitrilu, citronellalu a cinnamaldehydu. Dalším zajímavým případem je ferrocen a nikelocen, které jsou složeny z kovových iontů Fe a Ni a jsou téměř uzavřeny do dvou cyklopentadienylových kroužků (obr. 8). Struktura je u obou látek téměř totožná, zatímco zápach ferrocenu je kafrovitý (připomíná chloroalkany) a nikelocen zapáchá olejovitě (připomíná cykloalkeny), (Turin, 1996). Existuje ještě mnoho dalších případů, kde tato teorie nebyla potvrzena. Navíc databáze, která obsahuje záznamy stovek tisíc molekul odorantů žádný jasný vztah mezi tvarem molekuly a jejím pachem nepotvrdila (Turin, 2001).



Obrázek 8.: Schéma ferrocenu ( $Fe^{2+}$ ) a nikelocenu ( $Ni^{2+}$ ). Tyto molekuly mají téměř totožný tvar ale odlišný pach, tudíž by měly aktivovat stejnou sadu olfaktorických receptorů, ale v tomto případě tomu tak není (Zarzo, 2007).

### **3.4.2 Teorie spektroskopie nepružného elektronového tunelování**

Po zpochybnění vibrační teorie L. Turin navrhl, že by nos mohl fungovat jako biologický spektroskop, který by reagoval na vibrační spektrum molekul. Jeho teorie spektroskopie nepružného elektronového tunelování (IETS) je non-optická forma vibrační spektroskopie (Turin, 1996), která je založena na nepružném rozptylu elektronů molekulárními náboji, a to je možné i když molekula nemá žádný celkový náboj, což je případ všech odorantů. V tomto případě by olfaktorické receptory pracovaly jako biologické spektrometry a rozeznávaly by molekulární vibrace (Hipps et Mazur, 2002).

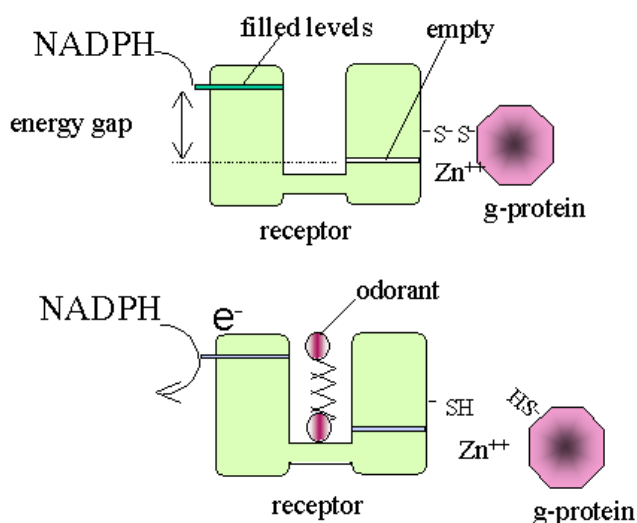
IETS pracuje na principu elektronového tunelování přes úzkou mezeru mezi kovovými elektrodami. To by v tomto případě mohlo být pravděpodobné, jelikož většina enzymů obsahuje kovové ionty, které se zapojují do přenosu elektronů (Turin, 1996). Turin (1996) vybral za vhodný kov zinek, jelikož je silně spjat s čichem. Bylo dokázáno, že nedostatek zinku způsobí reverzibilní ztrátu čichu. Zinek je běžný v mnoha metaloproteinech (Coleman, 1998) a je velmi rozšířen v celém centrálním nervovém systému. Také aktivuje, váže či upravuje funkce některých GPCR v nervovém systému. To by potvrzovalo klíčovou roli zinku při aktivaci olfaktorických receptorů (Zarzo, 2007). Dříve bylo v této souvislosti uvažováno i o mědi (Cu) a manganu (Mn), (Crabtree, 1978). Crabtree (1978) navrhl, že Cu je nejvíce pravděpodobný kandidát na metaloprotein v olfaktorickém receptoru, protože dobře váže silné těkavé látky (např.: thioly). Duan et al. (2012) dokázal, že Cu je nepostradatelná pro detekci thiolů a látek obsahujících síru. Tuto studii provedl na myších olfaktorických receptorech v oblasti MOR2443. Když použil látku, která naváže Cu v nosní dutině, tak aby nebyla k dispozici v olfaktorických receptorech, pak tyto myši nebyly schopny detekovat thioly.

#### **3.4.2.1 Mechanismus rozeznávání odorantů založený na spektroskopii nepružného elektronového tunelování**

IETS pracuje na principu interakce elektronového tunelování přes úzkou mezeru mezi kovovými elektrodami. Pohybující se elektronový náboj interaguje s časově proměnnými molekulárními dipóly, které mohou být elektronické nebo vibrační a vyvolat excitaci molekuly v bariéře se současnými ztrátami energie elektronu (Hipps et Mazur, 2002). Když je mezera prázdná, přejdou tunelované elektrony přes mezeru konstantní rychlostí a tok tunelování je úměrný překrývání mezi plnými a prázdnými elektronovými místy v kovu. Je-li

molekula v mezeře, tak se elektronové tunelování rozdělí na nabitě části tvořící atom. Molekula tak ztrácí energii a excituje jeden z vibračních režimů. Uvolněné elektrony mohou vzbudit molekulární vibraci, nebo tunelovat do druhého kovu s nižší energií.

IETS s proteiny by zahrnovala přidávání a odebrání elektronů na přesně definované energetické hladině po obou stranách odorantu o velikosti  $< 300$  Daltonů. Na jedné straně mezery by bylo obsazené donorové místo, zatímco na druhé straně mezery by bylo prázdné místo akceptora. Pokud by se mezi donorem a akceptorem nic nestalo, musela by přijít energie, která je na stejné zdrojové úrovni jako v mezeře na straně akceptora. K tunelování by tak došlo pouze tehdy, pokud by molekulární vibrační energie  $E$  odpovídala energetickému rozdílu mezi energetickými hladinami donora a akceptora. Receptor by pak pracoval jako spektrometr, který umožňuje detekovat samostatnou správně definovanou energii  $E$ . Tok tunelování by se dostal přes mezeru pouze tehdy, když by molekula s příslušnou vibrační energií byla v mezeře. Donor a akceptor v tunelovacích mezerách by měli mít šířku  $2kT$  ( $\sim 400 \text{ cm}^{-1}$ ). Rozsah  $0 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ , odpovídá 10 typům receptorů (Turin, 1996).



Obrázek 9.: Schéma transdukčního mechanismu při IETS. Proteinový receptor přijímá elektrony od rozpustných donorových elektronů (NADPH). Když je receptorové vazebné místo prázdné (nahore), elektrony nejsou schopny tunelovat přes vazebné místo, to lze, jen pokud je toto místo obsazené. Když molekula pachu (zde jako elastický dipól) obsadí vazebné místo (dole), pak mohou elektrony při tunelování ztratit energii a tím vzbudit vibrační režim. K tomu dochází pouze v případě, že energie vibračního režimu se rovná energii mezery mezi plnou a prázdnou úrovní. Elektrony pak protékají skrz protein a snižují disulfidový most, přes který projdou zinkové ionty a uvolní tím G - protein pro další kroky transdukce (Turin, 1996).

## 4. Závěr

Teorie transdukčního mechanismu primární olfaktorické recepce zatím nepřinesly přesvědčivý důkaz, který by je potvrdil nebo vyvrátil. Existují odoranty, které svým tvarem a chováním odotopovou teorii potvrzují, ale existuje i mnoho takových, které ji vylučují. Podle odotopové teorie by měly molekuly s podobným tvarem mít i podobný zápach. Například u thiolů a alkoholů však tomu tak není. Tyto skupiny mají podobné tvary molekul, ale rozdílné pachy.

Vibrační teorie již byla zavrhnuta, jelikož nebylo nalezeno žádné pravděpodobné vysvětlení, jak by nos mohl pracovat jako biologický spektroskop. Na tuto problematiku navazuje Luca Turin s teorií spektroskopie nepružného elektronového tunelování. Ale ani tato teorie věrohodně nevysvětluje interakci molekuly pachu s olfaktorickými receptory. Zdá se být pravděpodobnější než teorie odotopová, ale plně nevysvětluje všechny možnosti interakce odorantů s receptory. Zajímavý je případ vanilinu a isovanilinu. Tyto molekuly se liší pouze postavením substituentů v benzoové skupině. Vanilin má bohatou vanilkovou vůni, zatímco vůně isovanilinu má slabší vůni s fenolickým nádechem. Tyto dvě molekuly mají podobnou strukturu i vibrační spektra, ale jsou cítit jinak. V tomto případě by se obě teorie mýlily. Je pravděpodobné, že transdukční mechanismus v olfaktorických receptorech pracuje na jiném mechanismu, než bylo původně předpokládáno. Pravděpodobně schází objevit ještě další část fyziologie rozeznávání odorantů nebo navrhnout novou teorii transdukčního mechanismu primární olfaktorické recepce.

## 5. Seznam literatury

**Amoore, J. E.** 1963. Stereochemical Theory of Olfaction. *Nature*, 198, 271 – 272.

**Araneda, R., C., Peterlin, Z., Zhang, X., Chesler, A., Firestein, S.** 2004. A pharmacological profile of the aldehyde receptor repertoire in rat olfactory epithelium. *Journal of Physiology* 555. 3, 743–756.

**Berghard, A., Buck, L.** 1996. Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G $\alpha$  o, G $\alpha$  i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade. *Journal of Neurosciences*. 16, 909-918.

**Bianchet, M., A., Bains, G., Pelosi, P., Pevsner, J., Snyder, S., H., Monaco, H., L., Amzel, L., M.** 1996. The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nature Structural Biology* 3, 934–939.

**Breer, H., Fleischer, J., Strotmann, J.** 2006. The sense of smell: multiple olfactory subsystems. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63, 1465–1475.

**Breer, H., Strotmann, J.** 1997. Olfactory receptor gene expression. *Cell & Developmental biology*, 8, 189–195.

**Brookes, J., C., Horsfield, A., P., Stoneham, A., M.** 2008. Odour character differences for enantiomers correlate with molecular flexibility. *J. R. Soc. Interface*, 6 (30), 75 – 86.

**Buck, L., Axel, R.** 1991. A Novel Multigene Family May Encode Odorant Receptors: A Molecular Basis for Odor Recognition. *Cell*, 65, (1), 175-187.

**Butler, A. B., Hodos, W.,** 2005. Comparative vertebrate neuroanatomy: evolution and adaptation. John Wiley and Sons, 715.

**Carr, V. M., Menco, B. Ph. M., Yankova, M. P., Morimoto, R. I., Farbman, A. I.** 2001. Odorants as cell-type specific activators of a heat shock response in the rat olfactory mucosa. *J. Comp. Neurol.*, 432, 425–439.

**Coleman, J. E.** 1998. Zinc enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 2, 222–234.

**Crabtree, R., H.** 1978. Copper (I) - Possible Olfactory Binding - Site. *J. Inorg. Nucl. Chem.* 40, 1453.

**Craven, B. A., Paterson, E. G., Settles, G. E.** 2010. The fluid dynamics of canine olfaction: unique nasal airflow patterns as an explanation of macrosmia. *J R Soc Interface*, 7(47), 933–943.

**Černý, H.** 2002. *Veterinární anatomie pro studium a praxi*. Noviko, a.s., 528.

**Dominy, N. J., Lucas, P. W., Osorio, D., Yamashita, N.** 2001. The sensory ecology of primate food perception. *Evolutionary Anthropology*, 10, 171–186.

**Doucette, R.** 1992. Glial cells in the nerve fiber layer of the main olfactory bulb of embryonic and adult mammals. *Microsc. Res. Techn.*, 24, 113–130.

**Duan, X., Block, E., Li, Z., Connelly, T., Zhang, J., Huang, Z., Su, X., Pan, Y., Wu, L., Chi, Q., Wu, L., Thomas, S., Zhang, S., Ma, M., Matsunami, H., Chen, G., Zhuang, H.** 2012. Crucial role of copper in detection of metal-coordinating odorants. *PNAS Early edition*, 10.1073v, 1 – 6.

**Farbman, A. I.** 1992. *Cell Biology of Olfaction*. Cambridge University Press, 282.

**Felicioli, A., Ganni, M., Garibotti, M., Pelosi, P.** 1993. Multiple types and forms of odorant-binding proteins in the oldworld porcupine *Hystrix cristata*. *Computational Biochemistry Physiology* 105B, 775–784.

**Firestein, S.** 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* 413, 211–218.



- Franco, M. I., Turin, L., Mershin, A., Skoulakis, E. M. C.** 2011. Molecular vibration-sensing component in *Drosophila melanogaster* olfaction. PNAS, 108, (9), 3797–3802.
- Frings, S.** 2009. Primary processes in sensory cells: current advances. J. Comp. Physiol. A, 195, 1–19.
- Gáborik, Z., Jagadeesh, G., Zhang, M., Spat, A., Catt, K., J., Hunyady, L.** 2003. The role of a conserved region of the second intracellular loop in AT1 angiotensin receptor activation and signaling. Endocrinology 144, 2220–2228.
- Getchell, T. V.** 1986. Functional properties of vertebrate olfactory receptor neurons. Physiol. Rev., 66, 772–818.
- Goldblatt, A., Gazit, I., Terkel, J.** 2009. Olfaction and Explosives Detector Dogs in Canine Ergonomics - The Science of Working Dogs. Taylor & Francis Group, 332.
- Gottfried, J. A.** 2010. Central mechanisms of odour object perception. Nature reviews neuroscience, 11, (9), 628 – 641.
- Hipps, K. W., Mazur, U.** 2002. Inelastic Electron Tunneling Spectroscopy in Handbook of Vibrational Spectroscopy. John Wiley & Sons Ltd., svazek 1, 3862.
- Holbrook, E. H., Mieleszko Szumowski, K. E., Schwob, J. E.** 1995. An immunochemical, ultrastructural, and developmental characterization of the horizontal basal cells of rat olfactory epithelium. J. Comp. Neurol., 363, 129 – 146.
- Huard, J. M. T., Youngentob, S. L., Goldstein, B. J., Luskin, M. B., Schwob, J. E.** 1998. Adult olfactory epithelium contains multipotent progenitors that give rise to neurons and non-neural cells. J. Comp. Neurol., 400, 469–486.
- Katada, S., Hirokawa, T., Oka, Y., Suwa, M., Touhara, K.** 2005. Structural basis for a broad but selective ligand spektrum of a mouse olfactory receptor: mapping the odorant-binding site. Journal of Neuroscience 25, 1806–1815.

- Keverne, E. B.** 1999. The Vomeronasal Organ. *Science*, 286, 716 – 720.
- Klopping, H. L.** 1971. Olfactory theories and the odors of small molecules. *J. Agric Food Chem.*, 19, 999 - 1004.
- Kondo, R., Kaneko, S., Sun, H., Sakaizumi, M., Chigusa, S., I.** 2002. Diversification of olfactory receptor genes in the Japanese medaka fish, *Oryzias latipes*. *Gene* 282, 113–120.
- Lagane, B., Ballet, S., Planchenault, T., Balabanian, K., Le Poul, E., Blanpain, C., Percherancier, Y., Staropoli, I., Vassart, G., Oppermann, M., Parmentier, M., Bachelierie, F.** 2005. Mutation of the DRY Motif Reveals Different Structural Requirements for the CC Chemokine Receptor 5 - Mediated Signaling and Receptor Endocytosis. *Mol Pharmacol*, 67, 1966–1976.
- Lancet, D., Sadovsky, E., Seidemann, E.** 1993. Probability model for molecular recognition in biological repertoires: Significance to the olfactory system. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90, 3715-3719.
- Laska, M., Fendt, M., Wieser, A., Endres, T., Salazar, L., T., H., Apfelbach, R.** 2005. Detecting Langer - or just another odorant? Olfactory sensitivity for the fox odor component 2, 4, 5 - trimethylthiazoline in four species of mammals. *Physiology and Behavior*, 84, 211–215.
- Laska, M., Seibt, A., and Weber, A.** 2000. Microsmatic primates revisited: olfactory sensitivity in the squirrel monkey. *Chemical Senses*, 25, 47–53.
- Löbel, D., Marchese, S., Krieger, J., Pelosi, P., Breer, H.** 1998. Subtypes of odorant-binding proteins: heterologous expression and ligand binding. *European Journal of Biochemistry* 254, 318–324.
- Ma, M., Grosmaître, X., Iwema, C. L., Baker, H., Greer, Ch. A., Shepherd, G. M.** 2003. Olfactory Signal Transduction in the Mouse Septal Organ. *The Journal of Neuroscience*, 23 (1), 317 – 324.

- Ma, M., Sheperd, G. M.** 2000. Functional mosaic organization of mouse olfactory receptor neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 97, 12869–12874.
- Mackay-Sim, A., Royet, J., P.** 2006. Structure and function of the olfactory system in *Olfaction and the Brain*. Cambridge University Press, 365.
- Malnic, B., Godfrey, P. A., Buck, L. B.** 2004. The human olfactory receptor gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101, 2584 – 2589.
- Malnic, B., Hirono, J., Sato, T., Buck, L. B.** 1999. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 96, 713–723.
- Marshall D. A., Maruniak J. A.** 1986. Masera's organ responds to odorants. *Brain Res.*, 366, 329–332.
- Menco, B. Ph. M., Birrell, G. B., Fuller, C. M., Ezeh, P. I., Keeton, D. A., Benos, D. J.** 1998. Ultrastructural localization of amiloride-sensitive sodium channels and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase in the rat's olfactory epithelial surface. *Chem. Senses*, 23, 137–149.
- Menco, B. Ph. M., Morrison, E. E.** 2003. Morphology of the Mammalian Olfactory Epithelium: Form, Fine Structure, Function, and Pathology in *Handbook Olfaction and Gustation*. Marcel Dekker, 1121.
- Mohedano-Moriano A., Pro-Sistiaga, P., Úbeda-Bañón, I., Crespo, C., Insausti, R., Martinez-Marcos, A.** 2007. Segregated pathways to the vomeronasal amygdala: differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience.*, 25, 2065–2080.
- Moran, D. T., Rowley, J. C. III, Jafek, B. W., Lovell, M. A.** 1982. The fine structure of the olfactory mucosa in man. *J. Neurocytol.*, 11, 721–746.
- Morrison, E. E., Costanzo, R. M.** 1990. Morphology of the human olfactory epithelium. *J. Comp. Neurol.*, 297, 1–13.

- Mucignat-Caretta, C.** 2010. The rodent accessory olfactory system. *J. Comp. Physiol. A.*, 196, 767 – 777.
- Oka, Y., Omura, M., Kataoka, H., Touhara, K.** 2004. Olfactory receptor antagonism between odorants. *EMBO Journal* 23, 120–126.
- Pilpel, Y., Lancet, D.** 1999. The variable and conserved interfaces of modeled olfactory receptor proteins. *Protein Science* 8, 969–977.
- Pixley, S. K., Farbman, A. I., Menco, B. Ph. M.** 1997. Monoclonal Antibody Marker for Olfactory Sustentacular Cell Microvilli. *The Anatomical Record*, 248, 307 – 321.
- Quignon P., Kirkness E., Cadieu E., Touleimat N., Guyon R., Renier C., Hitte Ch., André C., Fraser C., Galibert F.** 2003. Comparison of the canine and human olfactory receptor gene repertoires. *Genome biology*, 4, 12, R 80.
- Rambotti, M. G., Saccardi, C., Spreca, A., Aisa, M. C., Giambanco, I., Donato, R.** 1989. Immunocytochemical localization of S-100  $\beta$  protein in olfactory and supporting cells of lamb olfactory epithelium. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 1825–1833.
- Rubin, B. D., Katz, L. C.** 1999. Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb. *Neuron* 23, 499–511.
- Sanz, G., Schlegel, C., Pernollet, J., C., Briand, L.** 2005. Comparison of odorant specificity of two human olfactory receptors from different phylogenetic classes and evidence for antagonism. *Chemical Senses* 30, 69–80.
- Seifert, K.** 1970. Die Ultrastruktur des Riechepithels beim Makrosomatiker. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung. In *Normale und pathologische Anatomie*, Heft 21, W. Bargmann and E. Doerr (Eds.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Sell, Ch.** 2006. Chemoreception in *The Chemistry of Fragrances - From Perfumer to Consumer*. RSC Publishing, 329.

- Settler, D. D., Axel, R.** 2009. Representations of odor in the piriform cortex. *Neuron*, 24, 63,(6), 854-64.
- Settles, G. S., Kester, D. A., Dodson – Dreibelbis, L. J.** 2002. The External Aerodynamics of Canine Olfaction in Sensors and Sensing in Biology and Engineering, Vienna & NY, 405.
- Shirokova, E., Schmiedeberg, K., Bedner, P., Niessen, H., Willecke, K., Raguse, J., D., Meyerhof, W., Krautwurst, D.** 2005. Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors: G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *Journal of Biological Chemistry* 280, 11807–11815.
- Scheer, A., Costa, T., Fanelli, F., De Benedetti, P., G., Mhaqutykodia, S., Abuin, L., Nenniger – Tosato, M., Cotecchia, S.** 2000. Mutational analysis of the highly conserved arginine within the Glu/Asp-Arg-Tyr motif of the  $\alpha 1b$ -adrenergic receptor: effects on receptor isomerization and activation. *Molecular Pharmacology* 57, 219–231.
- Singer, M., S., Oliveira, L., Vriend, G., Shepherd., G., M.** 1995. Potential ligand-binding residues in rat olfactory receptors identified by correlated mutation analysis. *Receptors & Channels* 3, 89–95.
- Singer, M., S., Shepherd, G., M.** 1994. Molecular modeling of ligand-receptor interactions in the OR5 olfactory receptor. *NeuroReport* 5, 1297–1300.
- Smith, R. L., Baker, H., Kolstad, K., Spencer, D. D., Green, C. A.** 1991. Localization of tyrosine hydroxylase and olfactory marker protein immunoreactivities in the human and macaque olfactory bulb. *Brain Res.* 548, 140–148.
- Spehr, M., Gisselmann, G., Poplawski, A., Riffell, J., A., Wetzel, C., H., Zimmer, R., K., Hatt, H.** 2003. Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. *Science* 299, 2054–2058.
- Tian, H., Ma, M.** 2004. Molecular Organization of the Olfactory Septal Organ. *The Journal of Neuroscience*, 24 (38), 8383 – 8390.

- Turin, L.** 1996. A spectroscopic mechanism for primary olfactory reception. *Chemical senses*, 21, 773 – 791.
- Turin, L.** 2001. A Method for the Calculation of Odor Character from Molecular Structure. *J. theor. Biol.* 216, 367–385.
- Turin, L., Yoshii, F.** 2003. Structure-odor relations: a modern perspective in *Handbook Olfaction a Gustation*. Marcel Dekker, 1121.
- Vaccarezza, O. L., Sepich, L. N., Tramezzani, J. H.** 1981. The vomeronasal organ of the rat. *J. Anat.*, 132, 2, 167 – 185.
- Vassar, R., Chao, S., K., Sitcheran, R., Nuñez, J., M., Vosshall, L., B., Axel, R.** 1994. Topographic Organization of Sensory Projection to the Olfactory Bulb. *Cell*, 79, 951-991.
- Vosshall, L., B.** 2003. Putting smell on the map. *Trends in Neurosciences*, 26, 169 – 170.
- Wright, R. H.** 1954. Odour and chemical constitution. *Nature*, 173, 831.
- Wysocki C. J., Wellington J. L., Beauchamp G. K.** 1980. Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science*, 207, 781–783.
- Yilmaz, B., Yildiz, H., Akkoç, C. Ö., Arican, İ.** 2008. Vomeronasal Organ in labrador Retriever Dog (*Canis familiaris*). *Bull Vet Inst Pulawy* 52, 185-188.
- Zarzo, M.** 2007. The Sense of Smell: Molecular Basis of Odorant Recognition. *Biological Reviews*, 82, 455-479.
- Zou, Z., Buck, L.** 2006. Combinatorial effects of odorant mixes in olfactory cortex. *Science*, 311, 1477 – 1481.
- Zou, Z., Horowitz, L. F., Montmayeur, J., Snapper, S., Buck, L. B.** 2001. Genetic tracing reveals a stereotyped sensory map in the olfactory cortex. *Nature*, 414, 173 – 179.

## 6. Seznam použitých zkratek

A1B – adrenergní receptory

AOB – accessory olfactory bulb, přídatný olfaktorický bulbus

AT1A – angiotensní receptory

cAMP - cyklický adenosinmonofosfát

CNG – cyklické nukleotidy aktivující iontový kanál

G $\alpha$ i2 – podjednotka GPCR

G $\alpha$ o - podjednotka GPCR

GPCR – G protein coupled receptors, receptor spřažený s G proteinem

IETS – inelastic electron tunneling spectroscopy, spektroskopie nepružného elektronového tunelování

MOE – main olfactory epithelium, hlavní olfaktorický epitel

mOR – EG - oblast olfaktorických neuronů

OB – olfactory bulb, olfaktorický bulbus

OBPs – odorant – binding protein, proteiny vázající odoranty

OC – olfactory cortex, olfaktorický kortex

OR 17 - oblast olfaktorických neuronů

OR37 – oblast olfaktorických neuronů

OR1G1 - oblast olfaktorických neuronů

OR S86 - oblast olfaktorických neuronů

RGS - regulátor signalizace G proteinu

TM – transmembrane, transmembránový

V1R – typ genové rodiny nacházející se ve vomeronazálním orgánu

V2R - typ genové rodiny nacházející se ve vomeronazálním orgánu

VNO – vomeronazální orgán