

Aus der Klinik für Hals-, Nasen und Ohrenheilkunde

Direktor: Prof. Dr. med. Th. Zahnert

**Die olfaktorische Wahrnehmung von Bourgeonal durch infertile und fertile
Männer und Genotypisierung des Bourgeonalrezeptors hOR 17-4**

Dissertationsschrift

zur Erlangung eines doctor medicinae (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von

Eva Kemper

aus Würselen

Dresden 2014

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Hintergrund	1
1.2. Problemstellung.....	2
1.3. Grundlagen	2
1.3.1. Der Geruchssinn.....	2
1.3.2. Das menschliche Riechrezeptorrepertoire	4
1.3.3. Ektopische Expression olfaktorischer Rezeptoren und Spermien-chemotaxis	5
1.3.4. Der olfaktorische Rezeptor hOR 17-4.....	6
1.3.5. Bourgeonal als Riechrezeptorligand menschlicher Spermien.....	8
1.3.6. Rezeptorfunktion von hOR17-4 in menschlichen Spermatozoen	9
1.3.7. Olfaktologie.....	10
1.3.8. Andrologie	15
1.3.9. Variabilität des Genoms	18
1.4. Fragestellung	20
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Ethischer Hintergrund	21
2.2. Probanden und Patienten	21
2.3. Studiendesign und Versuchsablauf.....	22
2.4. Anamnese.....	23
2.5. Sniffin' Sticks.....	24
2.5.1. Identifikation	25
2.6. Diskriminations- und Schwellentestung.....	27
2.6.1. Geruchsschwelle	28
2.7. Subjektive Intensitätseinstufung.....	29
2.8. Charakterisierung von Varianten des OR17-4 Gens	30
2.8.1. Experimenteller Ansatz.....	30
2.8.2. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	31
2.8.3. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.8.4. DNA- Sequenzierung	32
2.8.5. Isolierung genomischer DNA aus Blut nach dem 'QIAamp DNA Mini Kit Tissue Protocol' (Qiagen)	33
2.8.6. Polymerase-Kettenreaktion	33
2.9. Statistische Analysemethoden	35
3. Ergebnisse	36

3.1. Deskriptive Statistik.....	36
3.2. Screeningtest der Sniffin' Sticks.....	36
3.3. Schwellen- und Diskriminationstestung.....	37
3.3.1. Phenylethylalkohol	38
3.3.2. Bourgeonal	38
3.3.3. Helional	39
3.4. Subjektive Intensitätsschätzung	40
3.4.1. Phenylethylalkohol	40
3.4.2. Bourgeonal	40
3.4.3. Helional	41
3.5. Ergebnisse der Genotypisierung	42
3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse.....	42
3.6.1. Sniffin' Sticks	42
3.6.2. Schwellen- und Diskriminationstestung.....	43
3.6.3. Intensitätsschätzung	43
3.6.4. Genotypisierung	44
4. Diskussion	46
4.1. Riechtestungen	46
4.2. Genotypisierung des Riechrezeptors hOR 17-4	49
4.3. Die Bedeutung von hOR 17-4 für Fertilität und Reproduktionsmedizin.....	51
5. Zusammenfassung.....	56
Summary	58
Erklärungen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
6. Thesen	60
Literaturverzeichnis	61
Abbildungsverzeichnis	73
Tabellenverzeichnis.....	74
Anhang	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Dank	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aq. dest.	Aqua destillata (Lat.: destilliertes Wasser)
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCCRC	Connecticut Chemosensory Clinical Research Center
CC-SIT	Cross- Cultural Smell Identification Test
CSSEP	Chemo-somatosensorisch evozierte Potentiale
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EEG	Elektroenzephalogramm
Engl.	Englisch
Et al.	et alii (Lat.: und andere)
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing-Hormon
GPCR	G protein-coupled receptor (Engl. : G Protein-gekoppelter Rezeptor)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
HCl	Chlorwasserstoff
hMG	Humanes Menopausengonadotropin/ Menotropin
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
kDa	Kilodalton
Lat.	Latein
MHC	Major histocompatibility complex (Engl.: Haupthistokompatibilitätskomplex)
min.	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
ms	Millisekunden
MRT	Magnetresonanztomogramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Numerus (Lat.: Anzahl)
N.; Nn.	Nervus; nervi (Lat.: Nerv; Nerven)
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OE	Olfaktorisches Epithel
OEP	Olfaktorisch evozierte Potentiale
OR/ ORN	Olfaktorische Rezeptoren/ Olfaktorische Rezeptorneurone

PCR	Polymerase chain reaction (Engl. : Polymerase-Kettenreaktion)
PEA	Phenylethylalkohol
SD	Standard deviation (Engl. : Standardabweichung)
SDI-Wert	Summenwert der Ergebnisse von Schwellen-,Diskriminations- und Identifikationstest
SEM	Standard error of the mean (Engl.: Standardfehler des Mittelwerts)
SNP	Single nucleotide polymorphisms (Engl.:Einzelnukleotidpolymorphismen)
Taq	Thermus aquaticus
UPSIT	University of Pennsylvania Smell Identification Test
VAS	Visuelle Analogskala
VNO	Vomeronasales Organ
WHO	World Health Organization (Engl. : Weltgesundheitsorganisation)

1. Einleitung

1.1. Hintergrund

Mit der Entdeckung der genetischen Familie der Geruchsrezeptoren Anfang der 90er Jahre durch die Neurophysiologin Dr. Buck und den Mediziner Dr. Axel gelang nicht nur der entscheidende Durchbruch zum Verständnis der molekularen Mechanismen des Riechens sondern auch ein wesentlicher Fortschritt in einem Forschungsbereich, dessen Verbindung zum Geruchssinn nicht offensichtlich ist: der menschlichen Befruchtung (Buck und Axel, 1991).

Bereits kurz nach der Beschreibung der olfaktorischen Rezeptoren im Riechepithel der Nase wurde deren Expression in verschiedenen Gewebearten beschrieben. Aufsehen erregte insbesondere der Nachweis von ungefähr 20 Genen in der männlichen Keimbahn, die Riechrezeptoren kodieren. Diese Rezeptoren kommen besonders in der späten Phase der Spermatogenese vor (Parmentier et al., 1992). Die ausschließliche oder bevorzugte Expression bestimmter Riechrezeptoren in spermatogenen Zellen, der im Gegensatz zu konventionellen olfaktorischen Rezeptoren der Nasenschleimhaut höhere Prozentsatz intakter Rezeptorsequenzen und eine stark ausgeprägte Aminosäurekonservation suggerieren eine physiologische Bedeutung (Spehr et al., 2003; Vosshall, 2004).

Die chemotaktische Kommunikation zwischen Spermien und Eizelle ist bei Organismen, die eine externe Befruchtung durchführen, essentieller Bestandteil einer erfolgreichen Reproduktion. Auf reifen Spermien exprimierte Signaltransduktionskomponenten interagieren dabei mit chemischen Liganden, die von der Eizelle abgegeben werden. So gelingt es, trotz zu überwindender räumlicher Distanz, einen erfolgreichen Befruchtungsvorgang sicherzustellen (Weyand et al., 1994; Walensky et al., 1995; Riffell et al., 2004). Das Vorkommen olfaktorischer Rezeptoren auf menschlichen Spermien gab der kontrovers geführten Diskussion um die Relevanz von Chemotaxis bei interner Befruchtung eine neue Basis. Spehr und seinen Mitarbeitern gelang es 2003 erstmals einen Riechrezeptor funktionell zu charakterisieren, der sowohl in der menschlichen Riechschleimhaut als auch auf Spermien vorkommt. Die identische physiologische Reaktion des Rezeptors hOR 17-4 in den unterschiedlichen Geweben lässt vermuten, dass ihm an beiden Expressionsorten die gleiche Rolle im Sinne einer chemotaktischen Zell-Zell-Kommunikation zukommt. Im Fall der testikulären Rezeptoren wird die Bedeutung einer gerichteten Navigation der Geschlechtszellen zueinander postuliert (Spehr et al., 2003).

1.2. Problemstellung

Die Hypothese einer dualen Funktion olfaktorischer Rezeptoren beim Riechen und Befruchtungsvorgang lässt die Frage aufkommen, ob eine fehlerhafte Rezeptorfunktion die physiologischen Prozesse einschränken könnte. In der vorliegenden Studie wurde diese Vermutung in einen klinischen Zusammenhang gebracht.

Es wurde untersucht, ob die Ursache einer idiopathischen Infertilität andrologischer Patienten, die sich aufgrund einer ungewollten Kinderlosigkeit ärztlich vorstellten, möglicherweise in einer defekten Aktivität des Riechrezeptors hOR 17-4 zu finden ist. Mittels Riechtestungen und einer genetischen Rezeptoranalyse wurde die olfaktorische Leistung der Patienten und die genetische Struktur von hOR 17-4 im Vergleich zu jungen Vätern untersucht.

1.3. Grundlagen

1.3.1. Der Geruchssinn

Bei vielen Tieren ist der Geruchssinn von entscheidender Bedeutung für das Überleben des Individuums und der Art. Olfaktorische Signale steuern Schlüsselfunktionen wie Nahrungsaufnahme, Reproduktionsverhalten und soziale Organisation. Als phylogenetisch alte Funktion lässt sich die Wahrnehmung olfaktorischer Stimuli bereits in der Chemotaxis einzelliger Organismen antreffen, auch hier mit der Funktion die Umwelt hinsichtlich potentieller Nahrungsquellen oder Gefahren erfassen zu können (Klinke und Pape, 2009).

Bei Spezies mit gut entwickeltem Geruchssinn ist der Anteil des Riechhirns am gesamten Endhirn groß. Im Laufe der Phylogenese übernehmen andere Sinne Leistungen des Geruchssinns, was sich auch in einer anatomischen Involution des Riechhirns morphologisch äußert (Gilad et al., 2003).

Dennoch ist der Geruchssinn auch beim Menschen für wichtige Funktionen entscheidend und seine Bedeutung wird durch den in den letzten Jahrzehnten erlangten Erkenntniszuwachs im Gebiet der Olfaktologie zunehmend wahrgenommen. Lange Zeit wurde dem Riechen gegenüber den sogenannten Fernsinnen Sehen und Hören, die eher zu bewussten kognitiven Prozessen beitragen, eine mindere Bedeutung zugeschrieben. Doch je mehr der Geruchssinn in seiner Organisation und Funktion verstanden wird, desto offensichtlicher wird seine Rolle im menschlichen Leben.

Unser Leben wird von Anfang an durch die Wahrnehmung von Gerüchen beeinflusst. Bereits intratuterin beginnt ab der 28.Schwangerschaftswoche die Geruchswahrnehmung des Fötus (Bartoshuk und Beauchamp, 1994). Der Übergang von Geruchsstoffen der mütterlichen Er-

nahrung in das Fruchtwasser konnte experimentell nachgewiesen werden (Beauchamp und Mennella, 2011) und ein Einfluss auf die spätere Entwicklung von Geruchs- und Geschmackspräferenzen wird unter anderem diesem Mechanismus zugeschrieben (Schaal et al., 2000). So geht man davon aus, dass die Hedonik, also die Bewertung einer Duftsubstanz in angenehm oder unangenehm für bestimmte Gerüche genetisch determiniert ist. Für den Großteil der Düfte aber einer Prägung unterliegt, die stark kulturabhängig sein kann (Ayabe-Kanamura et al., 1998).

Der Geruchssinn ist eine wichtige sensorische Qualität für die Feinanpassung der frühen Mutter-Kind Beziehung. Unmittelbar postnatal kann das Neugeborene seine Mutter über olfaktorische Stimuli erkennen und essentielle Mechanismen, wie der Stillbeginn werden über Duftstoffe gefördert (Varendi und Porter, 2001; Mizuno et al., 2004).

Der im Haupthistokompatibilitätskomplex (Engl.: major histocompatibility complex = MHC) determinierte Eigengeruch eines Menschen ermöglicht die olfaktorische Selbst- und Fremderkennung, denn je näher verwandt und demnach genetisch ähnlicher der MHC, desto mehr gleicht sich der Eigengeruch. Somit ergibt sich eine Art „Familiengeruch“, was am Beispiel eineiiger Zwillinge deutlich wird, die sich in ihrem Körpergeruch aufgrund eines nahezu identischen MHCs praktisch nicht voneinander unterscheiden (Kuhn und Natsch, 2008). Der biologische Sinn dieser geruchlichen Abgrenzung von genetisch ähnlichen zu verschiedenen Individuen liegt vermutlich in der Favorisierung eines Partners mit vom eigenen divergierenden MHC und der daraus resultierenden Erhöhung der Diversität des genetischen Pools. Dies kann die Fehlgeburtenrate, Verbreitung von genetischen Erkrankungen oder die Immunabwehr eventuell positiv beeinflussen (Wedekind und Penn, 2000).

Die Rolle von Pheromonen, definitionsgemäß chemische Botenstoffe, die innerhalb einer bestimmten Art und zu gegenseitigem Benefit von Sender und Empfänger als Signalstoffe zur Kommunikation genutzt werden, ist beim Menschen noch nicht eindeutig erforscht. Das sogenannte Vomeronasalorgan auch Jacobson-Organ, dem insbesondere die Detektion von Pheromonen zugeschrieben wird, ist beim Menschen im Gegensatz zu vielen Tieren zurückgebildet und wahrscheinlich funktionslos. Einige Studien deuten darauf hin, dass bestimmte biologische Abläufe von „sozialen Düften“ manipuliert werden (Meredith, 2001; Witt und Hummel, 2006). Es ist bekannt, dass sich die Geruchsempfindung und Bewertung von Frauen durch hormonelle Steuerung abhängig von der jeweiligen Zyklusphase ändert. So wurde in einer Studie Androsteron, ein Duft aus dem Achselschweiß von Männern, zum Zeitpunkt der Ovulation von den getesteten Frauen signifikant positiver bewertet als in anderen Zyklusphasen (Preti et al., 2003).

Häufig wird die Bedeutung, die der Geruchssinn für den Menschen hat, erst nach dessen Verlust oder bei erheblicher Einschränkung deutlich. Gerüche haben eine starke emotionale Komponente, wecken Erinnerungen, lassen uns Menschen erkennen und die Nahrungsaufnahme genießen, sind wichtig für die Körperhygiene und das Erkennen von Gefahren.

Eine Einschränkung der Riechleistung bedeutet für den Patienten daher häufig einen großen Verlust an Lebensqualität (Hummel und Nordin, 2005).

1.3.2. Das menschliche Riechrezeptorrepertoire

Mit der Vergabe des Nobelpreises für Medizin und Physiologie im Jahre 2004 für die Erforschung der Geruchsrezeptoren und der Organisation des Geruchssinns an Dr. Buck und Dr. Axel richtete sich das öffentliche Interesse auf einen im Vergleich zum Sehen und Hören zuvor eher wenig beachteten Bereich der Sinnesphysiologie (Hatt, 2004).

Buck begeisterte sich für die Fähigkeit des Riechsystems eine offenbar unbegrenzte Anzahl unbekannter Substanzen zu erkennen. Die Vermutung der Forscherin war, dass die Riechzellen dafür eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Duftrezeptoren exprimieren müssten. In ähnlicher Form ist dies vom Immunsystem bekannt. Das unspezifische und adaptive Abwehrsystem ist in der Lage ist, körpereigene Zellen von fremden Strukturen aufgrund von Oberflächenproteinen zu unterscheiden und mit der Ausbildung spezialisierter Antikörper zu reagieren (Ljunggren und Kärre, 1990). Buck und Axel gelang es eine Multigenfamilie von Geruchsrezeptoren aus dem Riechepithel der Ratte zu isolieren (Buck und Axel, 1991). Mittels Polymerase-Kettenreaktion konnte bewiesen werden, dass sie zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören und als strukturelle Gemeinsamkeit mit je sieben transmembranen Regionen in der Plasmamembran von Zellen liegen. Mit der Beschreibung der Riechrezeptoren gelang den Forschern der Nachweis der vermutlich größten Genfamilie des menschlichen Genoms (Glusman et al., 2001). Die dazugehörigen Gene bestehen ausschließlich aus Exons, wodurch die Möglichkeit des alternativen Spleißens der RNA als Erklärung für die Vielfalt von Rezeptoren ausgeschlossen wird. Bei Säugetieren gibt es etwa 1300 separate Gene für Riechrezeptoren, was einem Anteil von 1,4-4% des Gesamtgenoms entspricht. Die Größe deutet auf eine entsprechend wichtige physiologische Bedeutung hin (Mombaerts, 2004).

Beim Menschen sind nur rund 350 Gene funktionsfähig geblieben, dies entspricht einem Genomanteil von 1% (Olender et al., 2004). Die übrigen Gene stellen durch Mutationen unbrauchbar gewordene Pseudogene dar, was ein Indiz dafür liefert, dass nur ein geringer Selektionsdruck auf den Erhalt des menschlichen Riechsystems wirkt (Gilad et al., 2003). Mittlerweile sind 17 für Riechrezeptoren kodierende Genfamilien bekannt, die mit Ausnahme der Chromosomen 20 und Y von allen menschlichen Chromosomen beherbergt werden und meist in Clustern organisiert sind.

1.3.3. Ektopische Expression olfaktorischer Rezeptoren und Spermienchemotaxis

Mit dem wissenschaftlichen Fortschritt im Bereich der Olfaktologie gelang auch ein Anstoß für neue Erkenntnisse in einem zunächst nicht unmittelbar verwandt erscheinenden Forschungsbereich: der Reproduktionsmedizin und dem Verständnis der menschlichen Befruchtung.

Dieser elementare biologische Prozess hat Forscher seit mehr als einem Jahrhundert beschäftigt und doch ist unser Wissen von vielen Aspekten immer noch rudimentär (Vacquier, 1998). Die Frage, wie es den kleinsten Zellen des menschlichen Körpers möglich ist, in wenigen Stunden eine Strecke von mehr als 3000 Gametenlängen bis zur befruchtungsfähigen Eizelle zurückzulegen, ist dabei von besonderem Interesse. Ohne zusätzliche Orientierungshilfe mutet das Zusammentreffen der Gameten einem reinen Zufallsprozess an, weshalb möglicherweise existierende Navigationsmechanismen seit Langem einen Diskussionspunkt darstellen. Für verschiedene Organismen, die vor allem im aquatischen Bereich leben und eine externe Befruchtung vollziehen (Seeigel, Korallen, Fische, Algen) ist die Möglichkeit der Geschlechtszellen, das zu befruchtende Ei zu erkennen und zielgerichtet im turbulenten Gewässer anzusteuern, von elementarer Bedeutung für einen erfolgreichen Befruchtungsvorgang. Hier konnten Signaltransduktionskomponenten auf Spermien und die Sekretion zahlreicher chemischer Botenstoffe von Seiten der Eizelle identifiziert werden, die eine gerichtete Navigation der Geschlechtszellen zueinander ermöglichen (Eisenbach, 1999).

Dass bei Spezies mit interner Befruchtung ebenso eine Kommunikation zwischen Spermien und Eizelle existiert und diese an einen aktiven chemotaktischen Prozess gekoppelt sein soll, schien weniger offensichtlich und war lange Zeit äußerst umstritten. Dies lag auch daran, dass ein brauchbarer physiologischer Erklärungsansatz fehlte. Doch nur kurz nach der Beschreibung der OR-Superfamilie im Genom der Ratte veröffentlichte eine belgische Forschergruppe um Parmentier Ergebnisse, die das Vorkommen von 20 Riechrezeptoren auf menschlichen Spermien demonstrierten und die Hypothese nahe legten, dass sie eine Rolle bei der Befruchtung spielen könnten (Parmentier et al., 1992).

In verschiedenen Veröffentlichungen der letzten Jahre wurde die Existenz von Riechrezeptoren außerhalb von Sinneszellen der Riechschleimhaut belegt, was auch mit dem Terminus ektopische Expression beschrieben wird. Für Riechrezeptoren ist ein Vorkommen in Erythrozyten, Myokardzellen, Ganglien des autonomen Nervensystems, Pyramidenzellen des zerebralen Kortex, Milz, Kolon, Prostata, Hirnstamm und vielen weiteren Gewebearten beschrieben (Feingold et al., 1999; Weber et al., 2002; Otaki et al., 2004; Feldmesser et al., 2006). Aufgrund dieses breiten Verteilungsmusters insbesondere während der Entwicklung,

wurden Vermutungen über eine mögliche Rolle von OR in der Zell-Zell-Kommunikation laut (Dreyer, 1998).

Die meisten der Berichte über ektopische Expression olfaktorischer Rezeptoren stehen jedoch in Zusammenhang mit einem Vorkommen in Hoden und Keimzellen, sowohl bei Ratten als auch beim Menschen. Die von Parmentier und Mitarbeitern 1992 beschriebenen Rezeptoren kamen besonders auf männlichen Keimzellen der späten Spermatogenese vor. In den darauffolgenden Jahren nutzte Parmentiers Arbeitsgruppe RNase-Schutzassays und konnte mit dieser Methode weitere OR identifizieren, die prädominant aber nicht ausschließlich testikulär exprimiert werden. In diesem Zusammenhang sprachen die Forscher von einer Gesamtanzahl von 50 OR. Diese Zahlen konnten auch in neueren Studien mit Hochdurchlaufmicroarrays bestätigt werden (Zhang et al., 2004). Einer anderen Forschergruppe gelang es mithilfe polyklonaler Antikörper ein Mitglied dieser Genfamilie zu isolieren. Mit der Zuordnung im Mittelteil und der Flagellumbasis reifer Spermien beim Hund konnten erstmals Rückschlüsse auf die vorherrschende Lage und physiologische Funktion bei Aktivierung der Rezeptoren gemacht werden (Vanderhaeghen et al., 1993).

Wenig später verwiesen auch Weyand und Mitarbeiter auf die Existenz von Ionenkanälen menschlicher Spermien, deren Struktur und Funktion analog zu Riechzellen waren (Weyand et al., 1994). Die identifizierten testikulären Rezeptoren konnten keiner spezifischen OR-Subfamilie zugeordnet werden. Der Anteil an erhaltenen Aminosäuren und intakten Sequenzen ist im Durchschnitt höher als bei nasalen Riechrezeptoren, was als Hinweis auf eine physiologische Funktion gewertet wurde (Branscomb et al., 2000).

1.3.4. Der olfaktorische Rezeptor hOR 17-4

Es dauerte noch einige Jahre bis der Hypothese um eine mögliche physiologische Funktion testikulärer OR ein direkter Versuchsansatz folgte. Hatt und Mitarbeiter identifizierten 2003 ein auf Chromosom 17 liegendes Gen, welches für den Riechrezeptor hOR17-4 (Synonym: OR1D2) kodiert. Der Rezeptor wird sowohl nasal als auch auf Spermatozoen exprimiert (Spehr et al., 2003). Für ihre Untersuchungen nutzen die Forscher ein rekombinantes System aus einer geklonten Transmembrandomäne von hOR17-4, die sie in embryonale menschliche Nierenzellen (HEK293) einschleusten. Es wurden die Segmente II-VII des Rezeptors gewählt, weil sich in diesem Bereich normalerweise die Bindungstasche von G-Proteingekoppelten Rezeptoren befindet. Anhand dieses Systems war es möglich, potentielle Liganden des Rezeptors und deren physiologische Effekte zu untersuchen.

Um das rezeptive Feld des Rezeptors zu bestimmen, wurde zunächst eine Mischung von 100 chemisch unterschiedlichen Duftsubstanzen (Henkel-100) eingesetzt. Später wurden Subfraktionen dieser Mischung getestet, wodurch der Strukturraum bioaktiver Kandidaten für den Rezeptor eingeschränkt wurde. Als einziger Stoff der Mischung führte Cyclamal zu einer

Aktivierung des Rezeptors und einem Anstieg der Kalziumkonzentration in den Nierenzellen. Um die Bandbreite an mögliche Liganden des Rezeptors zu erfassen, wurde im Folgenden Cyclamal als molekulare Schablone genutzt und strukturell verwandte Verbindungen eingesetzt. So konnte schrittweise der stärkste Agonist des Rezeptors ermittelt werden (Spehr et al., 2003).

Wie Abbildung 1.1 verdeutlicht, scheint die Präsenz einer Aldehydgruppe, die über eine Kohlenstoffkette von 2 oder 4 Atomen mit einem aromatischen Ring verbunden ist (aromatischer Aldehyd vom Typ 3-Phenylpropanol), die Schlüsselkomponente eines Liganden mit effektiver Rezeptoraktivierung zu sein. Ein zusätzliches Vorkommen von Methylgruppen in der Seitenkette und Isopropyl- und tert-Butyl-Substituenten in para-Position am Ring werden toleriert und verstärkt die Wirkung. Im Gegensatz dazu inaktivieren polare Substituenten, die zum Beispiel im Duftstoff Helional vorkommen, oder eine Doppelbindung in der Seitenkette das Molekül.

Abbildung 1: Cyclamal als Template für das rezeptive Feld von hOR 17-4, aktive und inaktive Liganden (Spehr et al., 2003).

Als Rezeptoragonist mit der stärksten Kalziumantwort in transfizierten HEK-293-Zellen konnte die Duftsubstanz Bourgeonal ermittelt werden, die wie Cyclamal zu den synthetischen Maiglöckchennoten gehört. Auch die beiden Substanzen Canthoxal und Lilial waren stärkere Agonisten als Cyclamal. Eine typische Eigenschaft von Riechrezeptoren ist es, von vielen verschiedenen Liganden mit unterschiedlicher Rezeptoraffinität aktiviert zu werden und testikuläre OR scheinen in dieser Hinsicht keine Ausnahme zu sein.

Abbildung 2: Aktive Liganden von hOR 17-4 (Spehr et al., 2003).

Im Zuge dieser Untersuchungen gelang es, den Rezeptor ebenso bezüglich eines Antagonisten zu charakterisieren. Bei der Anwendung einer Substanzmischung namens Henkel-Mix 10/2, die unter 10 verschiedenen Duftstoffen auch Bourgeonal enthält, wurden keine Ca^{2+} -Einströme ausgelöst. Um zu erfahren, welche Substanz für die fehlende Kalziumantwort verantwortlich war, applizierte man die 9 anderen Komponenten der Mischung jeweils einzeln in Kombination mit Bourgeonal.

Abbildung 3: Henkel Mix 10/2 mit Undecanal und Bourgeonal (Spehr et al., 2003).

Abbildung 3 zeigt die Zellantworten nach Applikation der Substanzen (repräsentative radiofluorometrische Aufzeichnungen des zytosolischen Kalziumniveaus der transfizierten HEK293 Zellen). Nur bei Koinkubation von Undecanal und bei alleiniger Anwendung dieses Duftstoffes blieb eine Antwort der Zellen aus. Ein kompetitiver Antagonismus um die Binde-tasche des Rezeptors wird aufgrund dieser Beobachtungen vermutet (Spehr, 2003).

Nach ihrer Aktivierung bedienen sich Geruchsrezeptoren zweier alternativer Signalkaskade-wege. Entweder öffnen Ionenkanäle über assoziierte Guaninnukleotide bindende Proteine (G-Proteine) und nach Aktivierung von Adenylatzyklase wird der second messenger zykli-sches Adenosinmonophosphat (AMP) produziert, was typisch für Vertebraten ist. Oder es kommt durch die Aktivierung einer Phospholipase C zur Hydrolyse von Phosphatidylinosit zu IP3 (Inosit-1,4,5-trisphosphat), was vor allem bei Invertebraten, Fischen, Crustaceen und Insekten der Fall ist und bei menschlichen Riechrezeptoren wohl eher für modulatorische Zwecke von Bedeutung bei der Signaltransduktion ist (Spehr et al., 2002).

Um die Frage zu klären, welcher Signaltransduktionsweg bei einer Aktivierung von hOR 17-4 eingeschlagen wird, wurden die geklonten Nierenzellen jeweils mit Bourgeonal und einem Inhibitor der Adenylatcyclase und der Phospholipase C inkubiert und die Reaktionen beobachtet. Eine Koapplikation mit dem Adenylatcyclase-Inhibitor MDL-12,330A unterdrückte eine Kalziumantwort während der Phospholipase C-Inhibitor keinen Effekt auf die Signal-transduktion zu haben schien. Somit liegt bei hOR 17-4 ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit cAMP-kontrollierter Signalverarbeitung vor (Spehr et al., 2004).

1.3.5. Bourgeonal als Riechrezeptorligand menschlicher Spermien

Spermatozoen sind kleine, hydrodynamisch geformte und bewegliche Zellen. Sie setzen sich aus einem Kopf (2-5 µm Durchmesser), der den Sitz des Zellkerns und Akrosoms darstellt, einem mitochondrienreichen Mittelstück, das den proximalen Teil des Flagellums bildet und dem Spermatozoenschwanz, der hauptsächlich aus einem zentralen Axonem besteht, zu-sammen (Benninghoff, 1993).

Abbildung 4: Schematische Anatomie des reifen Spermatozoen (Benninghoff, 1993).

Die vom Keimepithel abgegebenen Samenzellen zeigen nach ihrer Sekretion und in der Phase des Reifungsprozesses im Nebenhoden zunächst keine Eigenbewegung, sondern werden durch peristaltische Wellen bis zu ihrer vollen Ausreifung transportiert. Erst im Ejakulat sind die Spermatozoen aktiv beweglich und zeigen hier charakteristische Bewegungsmuster des Flagellums sowie ein typisches Schwimmverhalten. Die Bewegungen beruhen auf pulsativen Filamentkontraktionen des Axonemas, die durch intrazelluläre Kalziumwellen ausgelöst werden (Luconi, 2003). Dieser Vorgang stellt die Voraussetzung für die Bewegung zum Ort der Fertilisation und zum Durchdringen des Kumulus und der Zona pellucida der Eizelle dar. Verschiedene Defekte des Axonemas wurden bereits als Ursache für eine gestörte oder fehlende Spermienmotilität identifiziert (Neugebauer et al., 1990).

Mit der Entdeckung von zuvor als neuronenspezifisch betrachteten Rezeptoren, Enzymen und Kanalproteinen auf Spermien liegt die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung dieser Elemente ebenso wie in Nervenzellen in intrazellulären Kalziumströmen münden könnte. Als Folge auf die ausgelösten Ionenflüsse wäre ein verändertes Schlagmuster des Flagellums und eine gesteigerte Spermatozoenbeweglichkeit denkbar und Störungen im Ablauf dieses Prozesses als Grund einer unzureichenden Motilität von Bedeutung (Spehr et al., 2006).

1.3.6. Rezeptorfunktion von hOR17-4 in menschlichen Spermatozoen

Um die zuvor am rekombinanten System aus embryonalen Nierenzellen getesteten Rezeptorreaktionen von hOR17-4 im physiologischen Umfeld zu untersuchen, gingen Spehr und Mitarbeiter zu Experimenten mit menschlichen Spermien von gesunden, fertilen Probanden über (Spehr et al., 2003). Erstaunlicherweise ließen sich all die zuvor gemachten Beobachtungen ohne Einschränkungen auf menschliche Spermienzellen übertragen. Die Empfindlichkeit intakter Spermatozoen auf Bourgeonal war etwa 100-fach höher als jene von rekombinanten HEK-Zellen, doch alle Reaktionen auf die oben genannten Testsubstanzen waren vergleichbar. Mit Hilfe computergestützter Videoanalysen wurde das Schwimmverhalten von Spermien in Gegenwart verschiedener Konzentrationsgradienten von Bourgeonal beobachtet. Gegenüber der Kontrolle mit menschlicher Tubenflüssigkeit (engl. human tubar fluid = HFT) ohne Zusatz von Bourgeonal zeigten die Zellen nach Aktivierung des OR verschiedene Veränderungen ihrer Bewegungsmuster. Es kam zu einer klaren Orientierung in Richtung Stimulus, die mit Anstieg des Bourgeonalgradienten immer deutlicher wurde. Die Schwimmgeschwindigkeit der Zellen erhöhte sich bei Konzentrationen von über 10^{-8} M um ein Vielfaches und es kam zu hyperaktiven Schwanzbewegungen und charakteristischen Umkehrbewegung hin zur Geruchsquelle (Spehr et al., 2003; Spehr et al., 2004).

Diese Experimente konnten somit erstmals nachweisen, dass eine chemotaktische Interaktion zwischen dem Duftstoff Bourgeonal und Spermien existiert. Auch auf die Substanz Undecanal zeigten Spermien Reaktionen, wie sie zuvor in Untersuchungen an embryonalen Nierenzellen festgestellt worden waren. Die typischen Bewegungsmuster wurden in Gegenwart von Undecanal vollkommen unterdrückt und die Zellen wurden orientierungslos und langsam, wodurch erneut der kompetitive Antagonismus des Stoffes belegt werden konnte. Mit diesen Ergebnissen gelang es Spehr und Hatt, die Bedeutung und Funktionalität eines Riechrezeptors für die Navigation menschlicher Spermien aufzuzeigen und die Hypothese der Chemotaxis als Schlüsselmechanismus zur erfolgreichen Befruchtung zu untermauern. Dieses Hintergrundwissen könnte in Zukunft besonders für die Reproduktionsmedizin von großer Bedeutung sein, denn Pathologien in einem der beteiligten Elemente sind als Grund für Infertilität denkbar.

Abbildung 5: Schwimmverhalten menschlicher Spermien in vitro nach Applikation von Bourgeonal und Kontrolle (Tubarflüssigkeit) (Spehr et al., 2003).

1.3.7. Olfaktologie

Anatomische Grundlagen des Riechens

Im Inneren der beiden Nasenhöhlen liegen drei wulstartige Gebilde übereinander, die als Conchen bezeichnet werden und mit Schleimhaut ausgekleidet sind. Neben dem vorherrschenden respiratorischen Epithel befindet sich ein ungefähr 2 x 5 cm² kleiner Bereich, der mit olfaktorischem Epithel ausgekleidet ist. Er beschränkt sich auf die obere Muschel, das Nasendach und die obersten Septumanteile und wird Rima olfactoria genannt.

Das olfaktorische Epithel setzt sich aus drei verschiedenen Zelltypen zusammen. Neben den eigentlichen etwa 10 bis 30 Millionen Riechsinneszellen finden sich Basalzellen und Stützzellen. Die Basalzellen sind pluripotente Zellen, aus denen sich die Riechzellen nach einem Lebenszyklus von 3-6 Wochen ständig regenerieren. Mit dieser Eigenschaft stellen Riechzellen eines der seltenen Beispiele für Neuronen im adulten Nervensystem dar, die zu regelmäßiger mitotischer Teilung fähig sind, was einen wichtigen Aspekt im Rahmen der Therapie von Riechstörungen darstellt (Schmidt, 2010).

Das Riechepithel ist von einer Schleimschicht überzogen, die von den Bowman-Drüsen und Stützzellen gebildet wird. Der das olfaktorische Epithel schützend bedeckende Mukus dient der Lösung von Duftstoffen, bevor sie an die speziellen Rezeptorproteine binden und der Aufrechterhaltung eines für den Riechvorgang unerlässlichen Ionengleichgewichts. Zudem wird ihm eine immunologische Schutzfunktion zugeschrieben. Am apikalen Ende der primären bipolaren Sinneszellen ragen zahlreiche Fortsätze (Zilien) in den Schleim, die in ihrer Membran die Riechrezeptoren tragen. Basal befindet sich ein markloses Axon. Die Axone der Riechsinnzellen vereinigen sich unterhalb der Siebbeinplatte, die sie gebündelt als Fila olfactoria durchziehen. Nach dieser Vereinigung spricht man vom Nervus olfactorius, der direkt zum Bulbus olfactorius zieht.

Im Bulbus kommt es zu einer Projektion von mehr als 1000 Axonen auf eine Mitralzelle, was als Konvergenz bezeichnet wird. Die Axone der Mitralzellen bilden den Tractus olfactorius.

Hier gibt es Verschaltungen zum Bulbus der anderen Seite, zu olfaktorischen Projektionsfeldern im Paleocortex (Riechhirn). Eine Weiterleitung geschieht zum Neocortex (Cortex praepiriformis), Limbischen System (Mandelkern, Hippocampus), vegetativen Kernen des Hypothalamus und der Formatio reticularis.

Physiologie des Riechvorgangs

Duftmoleküle gelangen sowohl mit dem Luftstrom der Inspiration vom Naseneingang, was als orthonasal bezeichnet wird, als auch retronasal während des Kau- und Schluckvorgangs über Mundhöhle und Pharynx zur Regio olfactoria. Dadurch trägt der Geruchssinn ganz wesentlich zur Geschmackswahrnehmung bei, denn ohne ihn wäre nur das Erfassen der 5 gustatorischen Qualitäten süß, salzig, sauer, bitter und Umami möglich (Lindemann, 2001). Der Hauptteil der Atemluft strömt durch die untere Concha, weshalb ein eher kleiner Anteil in Kontakt mit den Sinneszellen der Riechschleimhaut kommt. Durch aktives Schnüffeln kann dieser Luftanteil erhöht werden, was zu einer stärkeren Geruchswahrnehmung führt. Die Duftstoffe diffundieren durch die Mukusschicht, die das olfaktorische Epithel bedeckt, und binden teilweise an spezifische Proteine (Engl.: odor binding proteins), bevor sie die Rezeptoren auf den Zilien der Riechsinnzellen erreichen.

Nach Bindung der Duftmoleküle an die Rezeptoren setzt eine Signalkaskade ein. Über ein stimulatorisches G-Protein (G_{olf}) wird das Enzym Adenylatcyclase aktiviert und die Produktion des second messengers cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) ausgelöst. Die Spie-

gelerhöhung von cAMP führt zur Öffnung unspezifischer Kationenkanäle, was wiederum den Einstrom von Natrium und Calcium und den Ausstrom von Chlorid-Ionen zur Folge hat. Durch die ausgelösten Ionenflüsse ändert sich das Membranpotential der olfaktorischen Nervenzelle und die Auslösung eines Rezeptorpotentials wird bewirkt. Auch Signaltransduktionskaskaden via IP3 und zyklischem GMP wurden beobachtet, deren Bedeutung jedoch noch nicht komplett entschlüsselt ist. Vermutlich kommt ihnen eher eine modulatorische Funktion im Rahmen der Signalverarbeitung zu. Bei ausreichend starker Depolarisation kommt es zur Generierung eines Aktionspotentials, dessen Frequenz abhängig von der Konzentration des Duftstoffes ist. Auf den Zilien der Sinneszellen wird jeweils nur ein bestimmter Rezeptortyp exprimiert und je nach Expression existiert eine spezifische Anordnung der Rezeptorneurone im Riechepithel, die für beide Nasenhälften symmetrisch ist. Da ein Duftreiz häufig aus einer Vielzahl von verschiedenen olfaktorischen Komponenten zusammen gesetzt ist und Überlappungsspektren der Rezeptorneurone bestehen, wird eine große Zahl spezifischer Sinneszellen durch eine Duftsubstanz aktiviert. Im Bulbus bildet sich dadurch ein duftstoffspezifisches räumliches und zeitliches Aktivitätsmuster, das nach seiner zentralen Weiterleitung zu einem Geruchseindruck führt und die Detektion von etwa 10.000 unterschiedlichen Düften beim Menschen möglich macht (Schmidt, 2010).

Einschränkungen der Riechfunktion

Um die Riechleistung eines Patienten und deren Störungen einzuteilen, wird häufig im klinischen Alltag zwischen qualitativen und quantitativen Riechstörungen unterschieden.

Qualitativ bedeutet hierbei eine veränderte Wahrnehmung von Gerüchen. Von Parosmie spricht man beispielsweise, wenn real existente Gerüche meist im negativen Sinne verändert wahrgenommen werden. Phantosmie, bezeichnet dagegen eine Geruchswahrnehmung, die ohne ein reales Stimuluskorrelat entsteht. Bei den quantitativen Riechstörungen wird die Normosmie, das subjektiv als normal empfundene Riechvermögen, von der Hyposmie und Anosmie abgegrenzt. Hyposmie beschreibt einen eingeschränkte Riechleistung. Die Anosmie kommt einem vollständigen Verlust des Riechvermögens gleich (Förster et al., 2004).

Als spezifische Anosmie bezeichnet man eine deutlich verminderte olfaktorische Sensibilität im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gegenüber einem bestimmten Geruchsstoff oder einer Duftstoffgruppe. Ein Erklärungsansatz für diese ‚Geruchsblindheiten‘ ist das Fehlen der für die Erkennung dieser Düfte notwendigen Rezeptormoleküle. So sind Anosmien für Urin (Hauptduftstoffkomponente: Androsteron, Häufigkeit in Prozent der Bevölkerung: 40%), Malz (Isobutanal, 36%), Campher (1,8-Cineol, 33%), Sperma (1-Pyrrolin, 20%), Moschus (Pentadecanolid, 7%), Fisch (Trimethylamin, 7%) und Schweiß (Isovaleriansäure, 2%) beschrieben (Schmidt, 2010).

Im Sinne einer Ursachen orientierten Betrachtung von Riechstörungen schlägt die Deutsche Gesellschaft für Olfaktologie und Gustologie eine Einteilung in sinunasale - also die Nase und/oder Nasennebenhöhlen betreffende Ursachen - und nicht-sinunasale Gründe für eine Riechleistungsminderung vor (Förster et al., 2004). Bei erstgenannter Gruppe liegt eine Störung innerhalb des Respirationstraktes vor, das olfaktorische System an sich ist primär nicht betroffen. Mit einem Anteil von 72% stellen sie die größte Ursachengruppe von Riechstörungen dar, wobei 53% durch Entzündungen der Nase oder der Nasennebenhöhlen und 19% durch respiratorische Störungen verursacht werden. Bei den nicht-sinunasalen Störungen sind dagegen Pathologien innerhalb der Riechbahn oder am olfaktorischen Epithel nachweisbar und ergeben einen Anteil von 28%. Sinunasale Ursachen können entzündliche Prozesse der Nase und Nasennebenhöhlen infektiöser, chronisch-entzündlicher oder allergischer Art sein (Guss et al., 2009; Yee et al., 2010; Eccles, 2011). Anatomische Begebenheiten, die beispielsweise die Nasenatmung stören, erlittene Traumata mit Kopfbeteiligung oder Operationen im Kopf- und Halsbereich sind andere Beispiele für mögliche Ursachen (Damm et al., 2003; Costanzo und Miwa, 2006).

Die Exposition mit toxischen Substanzen, worunter auch eine Reihe von Medikamenten fällt, kann zu lokalen Schädigungen des Riechepithels führen. Auch Alkohol- und Nikotinkonsum können sich negativ auf die olfaktorische Perzeption auswirken (Rupp et al., 2004; Venne-mann et al., 2008). Selten sind angeborene Dysosmien, bei denen eine subjektive Beeinträchtigung typischerweise nicht vorliegt, da zeitlebens keine Geruchswahrnehmung stattgefunden hat. In bildgebenden Verfahren ist teilweise eine Hypo- oder Aplasie des Bulbus olfactorius sichtbar. Ein Beispiel ist das Kallmann-Syndrom, bei dem ein angeborener hypogonadotroper Hypogonadismus und eine Anosmie vorliegen, deren Ursache ein neuronaler Migrationsdefekt der GnRH- und der olfaktorischen Neurone ist (Dodé und Hardelin, 2004).

Hyp- oder Anosmie sind ebenso im Zusammenhang mit zahlreichen internistischen und neurologischen Erkrankungen beschrieben. So können Hyper- und Hypothyreose, Diabetes mellitus (Svacina, 2007), Nieren- und Lebererkrankungen (Temmel et al., 2005) mit einer Verschlechterung der olfaktorischen Wahrnehmung einhergehen. Das bekannteste Beispiel neurologischen Krankheiten mit einer Auswirkung auf die Riechfunktion als Frühsymptom ist der Morbus Parkinson (Herting et al., 2008). Weitere zentralnervöse Erkrankungen mit beschriebenen Effekten auf das Riechvermögen sind Demenzerkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Korsakow-Syndrom, rezidivierende Epilepsien und Schizophrenie (Kohler et al., 2001, Naudin et al., 2013). Eine Riechstörung, die in keine der genannten Ursachen-gruppe zuzuordnen ist, gilt solange keine Einteilung möglich ist als idiopathisch. Mit zunehmendem Wissen über potentielle Auslöser von Riechstörungen und ausführlicher Diagnostik, sollte es möglich sein, die Anzahl dieser Ausschlussdiagnose weiter zu minimieren. Die höchste Inzidenz von Riechstörungen wird in der Altersgruppe der über 80-jährigen mit 50% beobachtet. Doch auch in wesentlich jüngerem Alter ist das Auftreten von Hyp- bezie-

ungsweise Anosmie weit verbreitet. Aktuell geht man davon aus, dass etwa 20% der Bevölkerung leichte bis mittelgradige Riechleistungsminderungen aufweisen. Die Anosmierate wird mit 5% bezogen auf die Gesamtpopulation angegeben (Brämerson et al., 2004; Landis et al., 2004). Die von den Betroffenen empfundene Beeinträchtigung ist dabei sehr individuell, so dass vorliegenden Störungen teilweise wenig wahrgenommen werden und eine ärztliche Vorstellung dementsprechend selten erfolgt.

Riechtestung

Die Prüfung des menschlichen Geruchssinnes an geruchshaltigen Medien wird als Olfaktometrie bezeichnet und gliedert sich in psychophysische und elektrophysiologische Testverfahren. Die auch als subjektiv bezeichneten psychophysischen Verfahren dienen zur Erfassung von Wahrnehmung und Verarbeitung externer physikalischer Reize in Abhängigkeit ihrer Konzentration. Eine subjektive Empfindung einer bestimmten Reizintensität wird anhand von standardisierten Fragestellungen gemessen. Dies erfordert die aktive Mitarbeit des Teilnehmers, wodurch die Methode von verschiedenen Faktoren wie Konzentration und Motivation der Testperson abhängig und dementsprechend vielen Fehlerquellen ausgesetzt ist. Im klinischen Alltag, in dem zeitlicher und personeller Aufwand bedacht werden muss, sind diese Testverfahren jedoch häufig einfacher zu praktizieren als elektrophysiologische Verfahren, die unabhängiger von diesen Störfaktoren sind (Hummel et al., 2001).

Die am häufigsten angewandte Untersuchungsmethode psychophysischer Teste ist die Identifikationsprüfung. Hierbei wird dem Probanden ein Duftstoff in überschwelliger Konzentration dargeboten, welcher aus mehreren vorgegebenen Antwortmöglichkeiten identifizieren muss. Da sich die Probanden auf eine Antwort festlegen müssen, bezeichnet man die zugrundeliegende Methode als 'forced-choice' (Englisch: erzwungene Wahl). Das Testergebnis wird durch die Summe der richtig identifizierten Geruchsproben dargestellt. Je größer die Anzahl der im Test beinhalteten Gerüche, desto genauer kann eine normale Riechfunktion von einer eingeschränkten olfaktorischen Leistung unterschieden werden (Cain, 1989; Doty, 1995; Hummel et al., 1997; Kondo et al., 1998).

Neben der Identifikationsleistung werden die Fähigkeit der Geruchsdiskrimination und die Geruchsschwelle für bestimmte Substanzen getestet. Eine Diskriminationsprüfung basiert meistens auf der sogenannten 'three-alternative-forced-choice' Methode. Dem Probanden werden drei Gerüche präsentiert, von denen zwei identisch sind. Die Testperson wird aufgefordert, den sich unterscheidenden Duft zu benennen.

Ehrenstein und Ehrenstein entwickelten 1999 eine Methode zur Testung der Wahrnehmungsschwelle, bei der ein Duftstoff in auf- und absteigenden Konzentrationen so lange dargeboten wird, bis die Testperson den Duftstoff zweimal hintereinander identifizieren kann (Ehrenstein und Ehrenstein, 1999). Die entsprechende Konzentration wird als Wahrneh-

nungsschwelle des bestimmten Duftstoffes definiert. Andere Verfahren bedienen sich dem Prinzip der logistischen Regression (Lötsch et al., 2004). Diskriminations- und Schwellentestungen können im Gegensatz zu Identifikationsuntersuchungen mehrfach angewandt werden, da eine Kenntnis des Testablaufes keinen Einfluss auf das Ergebnis hat.

In den letzten Jahrzehnten wurden standardisierte Tests zur quantitativen, psychophysischen Untersuchung von Riechstörungen entwickelt und validiert. Diese Tests erlauben eine detaillierte Beurteilung des Riechvermögens und können zur diagnostischen Einteilung zwischen Anosmie, Hyposmie oder Normosmie als auch bei Verlaufsbeobachtungen sinnvoll angewandt werden. In diesem Zusammenhang seien die ‚Sniffin‘ Sticks‘ (Kobal et al., 1996), der University of Pennsylvania Smell Identification Test (UPSIT, Doty et al., 1984) und der Connecticut Chemosensory Clinical Research Center Test (CCCRC, Cain et al., 1988) erwähnt. Um einen Überblick über die Riechleistung eines Menschen zu gewinnen und grundsätzlich eine Anosmie auszuschließen, wurden verschiedene Screeningtests entwickelt, teilweise als Auskopplung aus kompletten Testbatterien (Aachener Rhinotest, Kremer et al., 1998; Züricher Riechtest, Simmen et al., 1999). 2001 entwickelten Hummel et al. den 12-Stifte-Screeningtest aus dem 16 Stifte beinhaltenden Identifikationstest der ‚Sniffin‘ Sticks‘-Testatterie (Hummel et al., 2001). Er ist für ein schnelles Screening der Riechfunktion gut validiert, wieder verwendbar und auf europäische Verhältnisse abgestimmt. Aufgrund dieser Vorteile und der Bewährung des Tests im klinischen Alltag wurde er in der vorliegenden Studie angewandt, um eine An- oder Hyposmie bei Patienten und Probanden auszuschließen.

1.3.8. Andrologie

Die Andrologie beschäftigt sich mit der Physiologie und Pathophysiologie der männlichen Fertilität und Sexualität sowie deren Diagnostik und Therapie. Nach der Definition der Weltgesundheitsorganisation hat sie die reproduktive Gesundheit des Mannes zum Gegenstand und wird als interdisziplinäres Fach von Urologen, Dermatologen und Endokrinologen ausgeübt.

Andrologische Diagnostik

Die andrologische Diagnostik setzt sich aus verschiedenen Teilbereichen zusammen, die als Gesamtbild betrachtet erlauben, eine Diagnose hinsichtlich der Fertilität des Patienten zu erstellen.

Hierzu zählen: Anamnese, klinische Untersuchung, makroskopische und mikroskopische Beurteilung des Ejakulats und eventuelle Spezialuntersuchungen bei weiterführenden Frage-

stellungen. Eine ausführlich erhobene Anamnese führt bereits bei einem Viertel der Patienten zu einer Diagnosestellung und hilft, die Prognose einer eventuell bestehenden Unfruchtbarkeit einschätzen zu können. Es gilt vor allem Dauer der Infertilität, vorausgegangene diagnostische Maßnahmen und Behandlungsversuche, schwere systemische Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Mukoviszidose, Morbus Crohn), längere Episoden einer medikamentöse Behandlung, Chemo-/Strahlentherapie, vorausgegangene chirurgische Eingriffe, Verletzungen oder Infektionen des Urogenitaltraktes, Störungen der Sexualfunktion, berufliche Tätigkeit, Alkohol- und Nikotinkonsum zu erfassen. Auch die Sexualanamnese und Anamnese der Partnerin sind von Bedeutung. Die klinische Untersuchung des Patienten und die makroskopische und mikroskopische Untersuchung des Ejakulats runden die andrologische Diagnostik ab.

Zur Qualitätssicherung der andrologischen Diagnostik erarbeitete die Subkommission der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft ‚Qualitätssicherung in der Andrologie‘ Empfehlungen (Anonymus, 1993), die sich eng an die bereits veröffentlichten Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Andrologie anlehnen (Wolff und Schill, 1996). Da die Ejakulatanalyse Hauptpfeiler und größte Fehlerquelle darstellt, sollte sie gemäß den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation von 1999 erfolgen (WHO Manual, 1999). In manchen Fällen können Spezialuntersuchungen richtungweisend sein (Erregerdiagnostik, Hormonbestimmungen, Antikörperbestimmungen, Überprüfung der akrosomalen Reaktion etc.).

Der Erfolg andrologischer Bemühungen kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden. Endpunkt und wichtigstes Kriterium der Ergebnisqualität ist der Eintritt einer Schwangerschaft. Hierbei fließen gynäkologische Faktoren mit ein, die eine Ergebnisanalyse andrologischer Therapiemaßnahmen erschweren. Von sehr hoher Aussagekraft sind die Befruchtungsraten im Rahmen einer In-Vitro-Fertilisation. Allerdings unterzieht sich nur ein Teil der andrologischen Patienten mit ihren Partnerinnen diesem Eingriff. Als Basiskriterien der andrologischen Erfolgskontrollen können daher zunächst Verbesserungen der klassischen SpermioGrammparameter bewertet werden, obwohl sie nur eine begrenzte Aussagekraft besitzen. Prinzipiell ist der Kontakt zu anderen Fachdisziplinen (Gynäkologie, Urologie, Endokrinologie, Humangenetik, Psychosomatik) von großer Bedeutung. Nach der erfolgten Diagnosestellung steht die Beratung des Paares zur weiteren Therapieplanung im Mittelpunkt.

Idiopathische Infertilität

Die Weltgesundheitsorganisation definiert den Begriff der Unfruchtbarkeit in einer Partnerschaft von Mann und Frau als eine Erkrankung des Reproduktionssystems, die zur Folge hat, dass eine Frau im reproduktiven Alter nach 24 Monaten trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr nicht schwanger wird (WHO ICMART glossary, 2009).

Die Angaben zur Prävalenz der Infertilität unterliegen einer erheblichen Schwankungsbreite, was unter anderem an unterschiedlichen Definitionskriterien liegt. So divergieren die in der Literatur angegebenen Zahlen von 6,8% bis 38,6% (Larsen, 2005). In einer aktuellen Studie, die das Vorkommen von ungewollter Kinderlosigkeit in Frankreich analysiert, konnten nach 12 Monaten 24% (19-30%) und nach 24 Monaten 11% (8-14%) der in die Studie eingeschlossenen Frauen nicht schwanger werden (Slama et al., 2012).

Die Daten älterer Studien in Deutschland ergeben ähnliche Prozentsätze unfreiwilliger Kinderlosigkeit. In der durch Gnoth et al. untersuchten Gruppe von 364 Frauen stellte sich bei 10,4% keine Konzeption ein (Gnoth et al., 2003). Der Begriff der Subfertilität wird verwendet, wenn eine eingeschränkte Zeugungs- beziehungsweise Empfängnisfähigkeit bei Männern oder Frauen besteht. Nach 48 Monaten blieben noch 5% der Untersuchten kinderlos, was als Ausdruck einer definitiven Infertilität gewertet wurde (Gnoth et al., 2005).

In Großbritannien durchgeführte Studien zeigen, dass bei einem von sieben Paaren (14%) Konzeptionsschwierigkeiten auftreten (Wilkes et al., 2009). Die Rate in vergleichbaren Gesellschaften wird mit 8%-20% angegeben (Whitman-Elia und Baxley, 2001; Case, 2003). Die jährliche Inzidenz der Infertilität liegt geschätzt bei 1,2 Paaren pro 1000 der Gesamtbevölkerung. Metaanalysen, die versuchen eine einheitliche Definition der Infertilität zu schaffen, um diese in demographischen und reproduktionsmedizinischen Studien nutzen zu können, geben eine Rate von 0,6% bis 3,4% primärer Infertilität und 8,7% bis 32,6% sekundärer Infertilität an (Gurunath et al., 2011; Mascarenhas et al., 2012).

Es gibt eine Reihe von Fertilitätsstörungen, deren pathophysiologische Ursachen bekannt sind und kausal behandelt werden können. Auch wenn die Versorgung des fertilitäts-gestörten Mannes weit weniger gut organisiert ist als die der Frau, zeigt die Analyse der Ursachenverteilung von Fertilitätsstörungen, dass bei bis zur Hälfte der Paare mit unerfülltem Kinderwunsch die Störungen beim Mann liegen (Stahl et al., 2012).

Darunter ist ursächlich häufig eine eingeschränkte Spermienmotilität zu finden. Diese kann beispielsweise durch Anti-Spermatozoen-Antikörper, Spermien-DNA-Defekte, erhöhtem Level an freien Sauerstoffradikalen oder Spermienstrukturdefekte bedingt sein. Die Störung kann natürlich auch auf weiterführenden Ebenen der Konzeption gestört sein (Stahl et al., 2012).

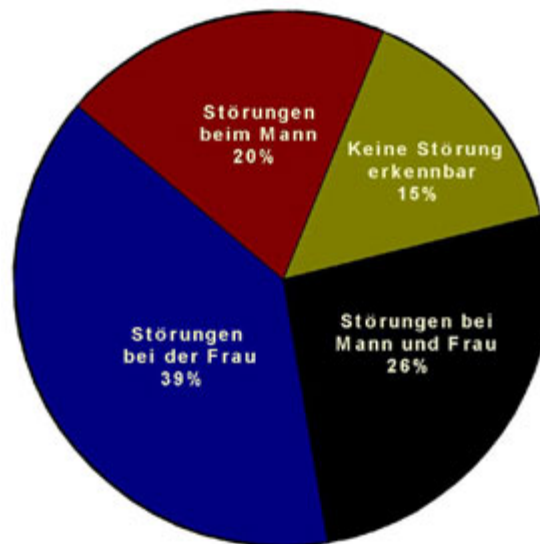


Abbildung 6: Verteilung der Ursachen ungewollter Kinderlosigkeit zwischen Mann und Frau (WHO 1987).

Für etwa 30% der Störungen der Zeugungsunfähigkeit des Mannes gibt es keine an den Ursachen orientierte Diagnose, so dass von idiopathischer Infertilität gesprochen wird (Hamada et al., 2012).

Auch eine nicht unerheblich große Gruppe der eine Fertilitätssprechstunde aufsuchenden Männer gehört dieser Gruppe von Patienten an. Wichtig ist dabei zu betonen, dass sie eine Ausschlussdiagnose darstellt und erst nach eingehender andrologischer Diagnostik bezüglich fertilitätsstörender Ursachen gestellt werden darf. Wahrscheinlich verbirgt sich hinter dieser Sammeldiagnose eine Vielzahl von unterschiedlichen pathogenetischen Mechanismen, die aufzuklären eine der wichtigsten und aktuellsten Aufgaben der Andrologie ist, um die verursachende Störung durch eine spezifische Therapie beheben zu können oder ein Verständnis ihrer Pathophysiologie im Rahmen der Grundlagenforschung zu erlangen, die mögliche therapeutische Interventionen ein Stück nähertreten lassen (Ko et al., 2012).

1.3.9. Variabilität des Genoms

Ein Merkmal des menschlichen Genoms und anderer Organismen ist die Existenz zahlreicher Unterschiede bezüglich Sequenz und Größe zwischen verschiedenen Individuen, was auch als genetischer Polymorphismus bezeichnet wird. Hauptsächlich finden sich diese Unterschiede in nicht-kodierenden Bereichen, also Sequenzen, die außerhalb der Gene liegen. Besondere Bedeutung haben in diesem Zusammenhang einzelne Unterschiede in einer Sequenz, die auch als Einzelnukleotidpolymorphismen (englisch: single nucleotide polymorphism, SNP) bezeichnet werden. Diese treten etwa alle 300 Basenpaare auf und sind neben Deletionen

oder Duplikationen die wichtigsten Unterschiede im Genom zwischen verschiedenen Individuen. Wenn sie sich in kodierenden Abschnitten befinden, werden sie als ‚coding SNP‘ (cSNP) bezeichnet. Bei einer solchen Lage in kodierenden Exons können SNP zu einer Modifikation des kodierten Proteins führen. Im menschlichen Genom ist die chromosomale Anordnung von über 1,5 Millionen SNP kartiert und im Internet als Datenbank verfügbar (Hinds et al., 2005). Aufgrund dieser Häufigkeit und der individuellen Unterschiede definieren SNP jeden gegebenen DNA-Abschnitt und es ergibt sich eine individuell spezifische Konstellation dieser Einzelnukleotidpolymorphismen. Ein bestimmter DNA-Bereich mit mehreren varianten Stellen wird als Haplotyp bezeichnet und kann als genetischer Marker verwendet werden. Dies hat besonders im Rahmen der Erkennung bestimmter Chromosomenabschnitte Bedeutung, auf denen Genloci liegen, die für Krankheiten dispositionierenden Allele beherbergen.

In der vorliegenden Studie waren mögliche SNP in kodierenden Bereichen des OR1D2-Gens von Interesse, die aufgrund Ihrer Lage in Exons eventuell zu einer Veränderung des Genproduktes, nämlich des Geruchsrezeptors für Bourgeonal führen und somit eine veränderte Wahrnehmung des Geruchsstoffes erklären könnten. Aufgrund der nasalen und ektopischen Expression dieses Rezeptors auf Spermien könnte bei Modifikation des Proteins sowohl eine veränderte Riechwahrnehmung als auch eine Einschränkung der Fertilität resultieren.

1.4. Fragestellung

Mehrere Studien beschreiben die Präsenz menschlicher Riechrezeptoren in verschiedenen Zelltypen. Dieser Studie liegt das Vorhandensein des Rezeptors hOR 17-4 in menschlichem Riechepithel und auf Spermien zu Grunde. Der Rezeptor scheint eine wesentliche Rolle in der Chemotaxis von Spermien zu spielen und somit eine kritische Komponente im Fertilitätsprozess darzustellen. Als einer der Hauptagonisten des Rezeptors konnte der Duftstoff Bourgeonal identifiziert werden. Es sollte untersucht werden, ob ein Unterschied zwischen der olfaktorischen Wahrnehmung des Duftstoffes von gesunden fertilen Probanden und andrologischen Patienten mit idiopathischer Infertilität festzustellen ist. Infertile Patienten könnten den Rezeptor nicht oder im Vergleich zur Normalbevölkerung verändert exprimieren, wodurch die Spermien weniger erfolgreich im Rahmen der Befruchtung sein könnten. Bezogen auf die Riechleistung könnte bei mangelhafter Rezeptorfunktion eine Minderung von Riechschwelle und Diskriminationsfähigkeit möglich sein. Einer eventuell vorhandenen Differenz der olfaktorischen Leistung könnte ein genetisches Korrelat im Sinne eines Polymorphismus oder einer Mutation zu Grunde liegen.

Dazu wurde im Speziellen untersucht, ob

- sich die Riechleistung im Screening Test der Sniffin' Sticks zwischen Probanden und Patienten unterschied und von einer gleichwertigen Riechfunktion auszugehen war.
- ein Unterschied der olfaktorischen Diskriminationsfähigkeit und Geruchsschwelle für die Duftstoffe Helional, Phenylethylalkohol und Bourgeonal festzustellen war.
- die subjektive Intensitätseinschätzung der einzelnen Reinsubstanzen unterschiedlich war.
- es eine Korrelation von Mutationen/ Polymorphismen im hOR 17-4 Gen und der Fähigkeit, den Duftstoff Bourgeonal wahrzunehmen, gab.
- ein spezifischer genetischer Haplotyp in der Gruppe der idiopathisch Infertilen häufiger vorkommt.

2. Material und Methoden

2.1. Ethischer Hintergrund

Alle Probanden und Patienten, die sich zu einer Teilnahme an der Studie bereit erklärten, wurden im Vorfeld über den Ablauf und den wissenschaftlichen Hintergrund der Studie aufgeklärt und unterzeichneten eine schriftliche Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Nutzung der ermittelten Daten. Es wurde erläutert, dass die Teilnahme freiwillig war und ohne Angabe von Gründen jederzeit abgebrochen werden konnte. Die Teilnehmer wurden darüber informiert, dass die Ergebnisse und jegliche den Teilnehmer betreffende Informationen entsprechend den Regeln der ärztlichen Schweigepflicht behandelt werden. Zudem wurde auf das Recht des Versuchsleiters hingewiesen, den Teilnehmer bei Nichterfüllen der Einschlusskriterien aus der Studie auszuschließen.

Die Studie wurde gemäß der Deklaration des Weltärztebundes von Helsinki über „Ethische Grundsätze für die medizinische Forschung am Menschen“ (World Medical Association General Assembly, 2004) durchgeführt.

Der Antrag zur Durchführung der Studie wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität Dresden geprüft und genehmigt (EK 106032011).

2.2. Probanden und Patienten

Die Probanden wurden durch Aushänge im Bereich der Universitätsklinik und im Raum Dresden oder durch direktes Ansprechen für die Studie gewonnen und mussten den zuvor festgelegten Auswahlkriterien gerecht werden. Es kamen junge Männer in Frage, die nach subjektiven Angaben über ein normales oder gutes Riechvermögen verfügten und zum Untersuchungszeitpunkt keine pathologischen Befunde im Hals-Nasen-Ohren Bereich oder andere anamnestische Auffälligkeiten aufwiesen, die Grund für eine Riechleistungs-minderung hätten sein können. Das Altersspektrum der Probanden sollte dem der Patienten möglichst exakt entsprechen. Die Probanden sollten über eine uneingeschränkte Fertilität verfügen. Dies wurde entweder mit einem bereits im Vorfeld der Studie durchgeführten Fertilitätsnachweis oder der anamnestischen Angabe Vater eines oder mehrerer Kinder zu sein belegt. Da die Fertilität des Mannes von vielen Faktoren abhängig ist, sollte die Zeugung des Kindes möglichst kurze Zeit zurückliegen (das Alter der Kinder lag bei durchschnittlich 20 Monaten). Um Normwerte für die Wahrnehmungsschwelle des Duftstoffes Bourgeonal in der männlichen Normalbevölkerung zu erhalten, wurden zu Beginn der Studie junge gesunde

Männer im Alter von 23-35 Jahren (Durchschnittsalter = 27 Jahre) getestet. Es ergab sich eine Probandenzahl von 48, darunter befanden sich 22 Männer mit direktem oder indirektem Fertilitätsnachweis.

Das Patientenkollektiv wurde in Zusammenarbeit mit der Leiterin der andrologischen Ambulanz der Klinik für Dermatologie des Universitätsklinikums Dresden Frau Dr. med. Petra Spornraft-Ragaller ausgewählt. Von Interesse waren Männer, die sich aufgrund eines seit über einem Jahr bestehenden unerfüllten Kinderwunsches in der andrologischen Ambulanz vorstellten. Die üblicherweise durchgeführte Diagnostik sollte eine unauffällige Anamnese, einen körperlichen Untersuchungsbefund ohne Pathologien und eine im Rahmen der mikroskopischen Ejakulatanalyse wiederholt nachgewiesene Normozoospermie zeigen, so dass von einer uneingeschränkten Fertilität ausgegangen werden konnte. Die Paaranamnese spiegelt wieder, dass die notwendigen Voraussetzungen für eine Konzeption erfüllt waren. Die jeweilige Partnerin musste eine unauffällige Anamnese bezüglich möglicher Einschränkungen der Fertilität aufweisen, was durch eine zusätzlich durchgeführte gynäkologische Diagnostik ohne pathologische Befunde belegt wurde. Stand eine weiterführende Untersuchung der Partnerin noch aus, wurde als Auswahlkriterium eine unauffällige gynäkologische Anamnese gefordert. Zusammenfassend ließ sich die Patientengruppe unter dem Stichwort Männer mit idiopathischer Infertilität charakterisieren.

2.3. Studiendesign und Versuchsablauf

Die Untersuchung wurde in zwei Sitzungen durchgeführt. Hintergrund und Ziel der Studie wurde den Teilnehmern erneut erörtert und auf sich ergebende Nachfragen ausführlich vor Durchführung der Untersuchungen eingegangen. Zu Beginn wurde eine ausführliche Anamnese anhand eines standardisierten Fragebogens des Interdisziplinären Zentrums für Riechen & Schmecken erhoben (siehe Anlagen). Da bei einigen Patienten zwischen der Durchführung der andrologischen Diagnostik und der Studienteilnahme längere Zeiträume lagen, wurde die andrologische Anamnese auf ihre Aktualität hin überprüft und bei sich ergebenden Abweichungen korrigiert dokumentiert. Auch die Anamnese der Partnerin wurde erneut bezüglich möglicher Veränderungen erfragt.

Nach der Anamneseerhebung wurde eine subjektiv-olfaktometrische Untersuchung mittels Sniffin' Sticks durchgeführt. Es wurde der Screeningmodus mit 12 Riechstiften genutzt (Hummel et al., 2001). Die Testung erfolgte unilateral. Es sollte eine Anosmie beziehungsweise Hyposmie ausgeschlossen werden, die einen Ausschluss aus der Studie bedeutet hätte. Als Grenzwert zwischen Normosmie und pathologischem Ergebnis wurden wenigstens 10

richtige Identifikationen veranschlagt. Bei lateralisierter Testung wird im Screeningmodus das Ergebnis der besseren Seite für die statistische Auswertung verwendet.

Der zweite Teil der Studie beinhaltete eine Diskriminations- und Schwellentestung für die Duftstoffe Bourgeonal, Helional und Phenylethylalkohol. Die Testung erfolgte nach der „3-alternative forced choice“-Methode mit im Vorfeld erstellten Verdünnungsreihen.

Zuletzt wurden die Studienteilnehmer aufgefordert anhand einer verbalen Bewertungsskala die Intensität der drei Duftstoffe in unverdünnter Form untereinander vergleichend subjektiv einzustufen (Skala von 0 bis 10, 0= keine Geruchswahrnehmung, 10= extrem intensive Geruchswahrnehmung). Die Gesamtzeit der Untersuchung lag zwischen 45 und 60 Minuten.

In einer zweiten Sitzung wurde eine venöse Blutentnahme von 10 ml EDTA-Blut als Material zur Genotypisierung des OR1D2-Gens bei den Teilnehmern durchgeführt, die sich dazu bereit erklärt hatten.

2.4. Anamnese

Bei allen Teilnehmern wurde eine ausführliche Anamnese anhand eines standardisierten Fragebogens des Interdisziplinären Zentrums für Riechen & Schmecken der Hals-Nasen-Ohren Klinik Dresden (siehe Anlagen) erhoben. Faktoren, die bekanntermaßen einen Einfluss auf das Riechvermögen haben können, sollten erfasst werden, da dies einen Ausschluss aus der Studie nach sich gezogen hätte. Es wurden Alter, Körpergröße und -gewicht, Ausbildung und derzeitige Tätigkeit erfasst. Erlittene Unfälle und vorausgegangene Operationen im Kopf-Halsbereich, neurologische und internistische Erkrankungen, Exposition mit für das Riechepithel toxischen Substanzen im beruflichen und privaten Umfeld, als auch Medikamenteneinnahme, Nikotin- und Alkoholkonsum, wurden unter Anderem erfragt. Da die andrologische Anamnese bereits weitgehend aus der Ambulanzakte bekannt war, wurde lediglich die Frage nach der Dauer des unerfüllten Kinderwunsches gestellt. Mündlich wurden die Patienten nach möglichen Änderungen in den zuvor erhobenen Daten gefragt (beispielsweise neuere Untersuchungsergebnisse von Spermioogrammen, Befunde der gynäkologischen Diagnostik der Partnerin wie Laparoskopie, Hormonanalysen).

Bei den Probanden wurde Vaterschaft und Alter des/r Kindes/r erfasst. Das subjektive Riechvermögen sollte anhand einer verbalen Bewertungsskala von „keine Riechwahrnehmung“ bis „sehr gut“ eingeschätzt werden. Dasselbe erfolgte für die Qualität der Nasenatmung im Seitenvergleich von „nicht durchgängig“ bis „sehr gut“.

2.5. Sniffin' Sticks

Im ersten Teil der Riechprüfung wurde das psychophysische Testverfahren der Sniffin' Sticks genutzt (Kobal et al., 1996). Der ursprüngliche Test setzt sich aus drei Einzelprüfungen zusammen: eine Wahrnehmungsschwellenbestimmung mit dem Duftstoff Phenethylalkohol, der Testung des Diskriminationsvermögens und der Identifikationsfähigkeit von bestimmten Gerüchen. In der vorliegenden Studie wurde nur der Identifikationssubtest verwendet. Für Schwellenbestimmung und Diskriminationstestung wurden Verdünnungsreihen mit den relevanten Substanzen erstellt.

Bei den Sniffin' Sticks dienen Stifte als Duftträger, deren Aufbau im Wesentlichen einem handelsüblichen Filzstift entspricht. Der Außenteil der Riechstifte wird von einem circa 14 cm langen Kunststoffröhrchen mit einem Innendurchmesser von 1,3 cm gebildet. Innerhalb des Röhrchens befindet sich der eigentliche Träger der Duftsubstanz: ein Filzstift, der mit 4 ml des entsprechenden Geruchsstoffes getränkt ist. Bei einigen Stoffen, beispielsweise Phenethylalkohol, wird der geruchsneutrale Stoff Propylenglykol als Lösungsvermittler eingesetzt. Der Geruchsstift ist mit einer Kappe versehen, nach deren Abnahme kommt es zur Freisetzung des Duftstoffes (Hummel et al., 1997). Bei der Durchführung wird die Stiftkappe vom Untersuchung für etwa drei Sekunden entfernt und die getränkte Stiftpitze 1-2 cm vor dem jeweils ungedeckten Nasenloch platziert. Die Testperson wird zu aktivem Riechen aufgefordert.



Abbildung 7: Sniffin' Sticks Screening 12 Test (Firma Burghart Messtechnik)



Abbildung 8: Durchführung der Sniffin' Sticks Untersuchung (Riech- und Schmecklabor, Uniklinikum Dresden, Bild von Dr. Bae-Gartz)

Ein Interstimulusintervall von mindestens 30 Sekunden sollte zur Verhinderung einer Geruchsdesensibilisierung eingehalten werden. Um die Summe externer Störfaktoren während der Untersuchung zu minimieren und eine optimale Präsentation der Geruchsstoffe zu garantieren, fanden die Sniffin' Sticks Untersuchungen genauso wie die weiteren Riechprüfungen in ruhigen, klimatisierten und gut belüfteten Räumen des Riech- und Schmecklabors statt. Die Patienten und Probanden durften mindestens eine Stunde vor der Untersuchung keine Nahrung mehr zu sich nehmen, Bonbons und Kaugummis sollten ebenso vermieden werden und nur noch Wasser getrunken werden. Während der Untersuchungen durfte nicht geraucht werden und auf starkes Parfüm oder andere starke Duftmittel sollte verzichtet werden.

2.5.1. Identifikation

Zur Prüfung der olfaktorischen Identifikationsleistung wurde der von Hummel und Mitarbeitern 2001 entwickelte Screeningtest der Sniffin' Sticks verwendet (Hummel et al., 2001). Der Test setzt sich aus folgenden zu identifizierenden Gerüchen und Distraktoren zusammen:

Stift	Deskriptoren			
1	Orange	Brombeere	Erdbeere	Ananas
2	Rauch	Klebstoff	Schuhleder	Gras
3	Honig	Vanille	Schokolade	Zimt
4	Schnittlauch	Pfefferminz	Fichte	Zwiebel
5	Kokos	Banane	Walnuss	Kirsche
6	Pfirsich	Apfel	Zitrone	Grapefruit
7	Lakritz	Gummibärchen	Kaugummi	Kekse
8	Zigarette	Kaffee	Wein	Kerzenrauch
9	Gewürznelke	Pfeffer	Zimt	Senf
10	Birne	Pflaume	Pfirsich	Ananas
11	Kamille	Himbeere	Rose	Kirsche
12	Brot	Fisch	Käse	Schinken

Tabelle 1: Aufbau des Screeningtests. Targets sind fett gedruckt, Distraktoren normal.

In der Studie wurden die Stifte wie in 2.5 beschrieben präsentiert. Die Testung erfolgte lateralisiert indem jeweils nur mit einem Nasenloch gerochen wurde. Die Seiten wurden mit jedem Stift gewechselt. Durch eine von der Computersoftware vorgegebene, randomisierte Reihenfolge der Stifte, sollte vermieden werden, dass sich die getestete Person die Begriffe zu gut merken konnte und ein besseres Ergebnis auf der zweiten getesteten Seite erzielen konnte. Es wurde ein ‚multiple-forced-choice‘-Modus angewandt. Anhand verbaler Antworttafeln musste die Testperson den Begriff wählen, der den dargebotenen Geruchsstoff am Treffendsten beschrieb.

Um dies zu ermöglichen, wurde dieser Testabschnitt unverblindet durchgeführt. Auch wenn eine Identifikation laut Testperson nicht möglich war, musste die Entscheidung für eine Antwortmöglichkeit getroffen werden.

Die Testdauer beläuft sich auf circa 4 Minuten, was als Vorteil für die Compliance bei der Studienteilnahme angesehen wurde. Erreichte Punktwerte von unter zehn deuten auf eine eingeschränkte, Werte von 4 auf eine aufgehobene Riechleistung hin. Werte von fünf oder sechs erlauben den Ausschluss einer Anosmie, wohingegen eine Differenzierung zwischen Norm- und Hyposmie aufgrund überlappender Bereiche nicht möglich ist (Gudziol und Förster, 2002). Ein Punktwert von 10 richtigen Identifikationen der besseren Nasenseite wurde für eine Studienteilnahme vorausgesetzt.

2.6. Diskriminations- und Schwellentestung

Die Diskrimination von Gerüchen beschreibt die Fähigkeit, verschiedene Duftsubstanzen voneinander zu unterscheiden. Diese Teilfunktion des Geruchssinns sollte für die einzelnen Duftstoffe Helional (HEL, CAS #1205-17-0), Bourgeonal (BOU, CAS #18127-01-0) und Phenylethylalkohol (PEA, CAS #60-12-8) getestet werden. Helional ist trotz chemisch ähnlicher Struktur zu Bourgeonal ein nicht aktiver Ligand des Rezeptors ORD1D2. Gleiches gilt für Phenylethylalkohol (Rosenduft). So dass diese beiden Substanzen als Kontrollen genutzt wurden. Alle drei Duftstoffe haben einen angenehmen und blumigen Geruch.

Durch die Untersuchung einer Geruchsschwelle kann bestimmt werden, ab welcher Konzentration eine bestimmte Substanz von der getesteten Person wahrgenommen werden kann. Beide Riechleistungen wurden in einem Testdurchlauf untersucht.

Da die Geruchsstoffe Bourgeonal und Helional nicht in der Standardbatterie der Sniffin' Sticks vorkommen, wurden Verdünnungsreihen mit den Duftstoffen hergestellt. Die aus 8 Stufen zusammengesetzten Reihen wurden einer geometrischen Verdünnung folgend hergestellt. Als Lösungsmittel wurde die Substanz 1,2-Propandiol genutzt. Die Duftstoffe wurden in einer 1:4 Verdünnung (ein Teil Duftstoff zu vier Teilen Lösungsmittel) beginnend mit 2 ml der Reinsubstanz in 125 ml erfassende, dunkle Glasflaschen gefüllt, die zuvor auf ihre Duftneutralität hin überprüft wurden. Nach einer ausreichenden Mischung der beiden Substanzen, wurden jeweils 2ml der zuvor erstellten Konzentrationsstufe in eine weitere Glasflasche mit 8 ml Lösungsmittelbasis pipettiert. Um auf ein Endvolumen von 8ml zu kommen, wurden 2 ml der achten Verdünnungsstufe verworfen.

Zur Sicherstellung weitgehend identischer Versuchsbedingungen sollten die hergestellten Reihen nicht länger als 4 Wochen, bei häufiger Nutzung maximal 3 Wochen genutzt werden. Um die Möglichkeit einer visuellen Detektion der duftstoffenthaltenden Glasflaschen zu verhindern, wurden die Untersuchungen mit einer blickdichten Maske durchgeführt (Hummel et al. 1997). Der verblindeten Testperson wurden jeweils drei geöffnete Glasflaschen zum Riechen angeboten. Die Präsentation erfolgte uninasal für etwa drei Sekunden in randomisierter Reihenfolge. Das Interstimulusintervall innerhalb eines Triplets lag bei circa 3 Sekunden. Um eine Geruchsdesensibilisierung zu verhindern, sollte zwischen den einzelnen Flaschentriplets wie bei der Identifikationstestung ein zeitlicher Abstand von mindestens 30 Sekunden eingehalten werden (Kobal et al., 1996; Hummel et al., 1997).

Unter den drei Flaschen befanden sich zwei ‚blanks‘, die nur mit 8 ml Lösungsmittel Propandiol gefüllt waren. Sie stellten Distraktoren zur dritten Flasche dar, die Geruchsstoff enthielt. Die Stoffe Bourgeonal, Helional und Phenylethylalkohol wurden wie in 2.6 beschrieben, ebenfalls in Propandiol gelöst, was die olfaktorische Detektion erschwerte.

Die Wahl, mit welcher Verdünnungsreihe begonnen wurde, legte ein randomisiertes Schema fest. Der Geruchssinn unterliegt bei einer großen Stimulusanzahl in einem kurzen Zeitintervall einer gewissen Desensibilisierung, die selbst bei Einhaltung definierter Pausen mit der Zeit eintritt. Die Konzentrationsfähigkeit der Testperson nimmt mit zunehmender Untersuchungsdauer ab, was sich ebenso auf die Riechleistung auswirken kann. Mit der Randomisierung der Reihenfolge sollte einem möglichen systematischen Fehler vorgebeugt werden. Der Untersucher benannte die dargebotenen Flaschen bei der Präsentation mit den Zahlen 1, 2 und 3, dadurch wusste der verblindete Teilnehmer, wann er den Stimulus zu erwarten hatte und konnte die wahrgenommene Geruchsinformation einer Zahl zuordnen. Die Aufgabe bestand darin, die duftstoffenthaltende Flasche zu identifizieren und ihre Zahl zu benennen, ohne den spezifischen Geruch benennen zu müssen. Im Sinne der „triple-forced-choice“ Methode musste sich die Testperson nach einer einmaligen Präsentation für eine Antwort entscheiden.

2.6.1. Geruchsschwelle

Zur Erfassung der Wahrnehmungsschwelle der Geruchsstoffe Bourgeonal, Helional und Phenylethylalkohol wurde nach ‚single staircase‘ Methode verfahren, die auch die Basis der Sniffin‘ Sticks Schwellentestung darstellt (Doty, 1991; Ehrenstein und Ehrenstein, 1999).

Die acht eingesetzten Flaschen der Verdünnungsreihen waren in absteigender Konzentration mit den einzelnen Duftsubstanzen gefüllt, so dass Flasche Nr. 1 die höchste und Flasche Nr. 8 die niedrigste Konzentration aufwies. Um dem Untersucher die Erinnerung der gewählten Reihenfolge zu erleichtern, waren die Glasflaschen mit Aufkleber versehen, die Inhaltsstoff und Konzentrationsstufe angaben. Dies erklärt die Notwendigkeit, die Testperson während der Untersuchung zu verblinden. Die Präsentation der Triplets mit der niedrigsten Duftstoffkonzentration (Nr. 8) stellte den Anfang der Untersuchung dar. Schlug eine Identifikation fehl, wurde das zwei Verdünnungsstufen niedriger gelegene Triplet präsentiert (Nr. 6). Sobald eine Verdünnungsstufe richtig identifiziert werden konnte, wurde dasselbe Triplet erneut präsentiert. Kam es zu einer zweiten richtigen Detektion, wurde diese Konzentrationsstufe als Wendepunkt definiert und protokolliert. Nun bewegt sich die Untersuchung wieder in Richtung niedrigerer Konzentrationsstufen, da im Folgenden die drei Flaschen der nächst höher gelegenen Stufe angeboten wurden. Nach der Bestimmung des ersten Wendepunktes erfolgten Auf- und Abbewegungen in den Verdünnungsreihen nur noch einstufig und nicht wie beim ersten Wendepunkt zweistufig. Dies hat den Hintergrund, dass für den Test ein praxiskompatibler Kompromiss zwischen einer sehr großen Anzahl von Testschritten und dem Vorteil einer hohen Reproduzierbarkeit und einer den Aspekt der Zeit-

ökonomie berücksichtigenden Einschränkung des Untersuchungsumfangs gefunden werden muss (Cornsweet, 1962).

So birgt ein kleinschrittiges Vorgehen bei der Wahl der Konzentrationssprünge die Gefahr der Ineffektivität, also wenig Informationsgewinn trotz langer Versuchsdauer. Dagegen kann bei der Wahl einer sehr großen Konzentrationsdifferenz zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen das Problem auftreten, dass die wirkliche Wahrnehmungsschwelle der Testperson nicht erfasst wird, da sie übersprungen wurde. Es wurden solange Triplets niedrigerer Konzentrationen angeboten, bis zwei aufeinander folgende Detektionen scheiterten.

Die zu diesem Versuchszeitpunkt verwendete Konzentrationsstufe stellte den zweiten Wendepunkt dar (siehe Abbildung 1.3). Nun bewegte sich die Testung wieder in die andere Richtung. Die Präsentation niedrigerer Konzentrationsstufen geschah erneut bis zu zwei aufeinander folgenden erfolgreichen Detektionen der duftstoffenthaltenden Glasflasche. Die Testung wurde bis zur Definition von fünf Wendepunkten durchgeführt. Die Geruchsschwelle der Testperson wurde als arithmetisches Mittel der letzten vier Wendepunkte definiert:

Wendepunkt 1 + 2 + 3 + 4

4

1					
2					
3					x x
4	x x		x x		o o
5		x x	x o	x x	x o
6	o	x o		x x	o
7				x o	
8	o				

Tabelle 2: Dokumentation Schwellen/Diskriminationstestung. Die ermittelte Schwelle liegt in diesem Beispiel bei 5,0.

2.7. Subjektive Intensitätseinstufung

Den letzten Teil der olfaktorischen Untersuchung stellte eine subjektive Intensitätseinschätzung anhand einer visuellen Analogskala dar. Die Studienteilnehmer wurden aufgefordert, die Intensität der drei verwendeten Duftstoffe in unverdünnter Form einzustufen. Die Skaleneinteilung reichte von 0 bis 10, wobei 0 für „keine Geruchswahrnehmung“ und 10 für „sehr intensive Geruchswahrnehmung“ stehen sollten. Die Aufgabe lag darin, die Intensität der einzelnen Substanzen miteinander vergleichend einzuschätzen.

2.8. Charakterisierung von Varianten des OR17-4 Gens

Im zweiten Teil der Studie wurde den Riechtestungen eine Genotypisierung des OR1D2-Gens angeschlossen. Die Patienten wurden durch ein Anschreiben über den Stand der Ergebnisse unterrichtet und erneut in das Riech- und Schmecklabor gebeten, um eine venöse Blutentnahme von 10 ml EDTA-Blut durchführen zu können. Von den 15 in die Studie eingeschlossenen Patienten erklärten sich 8 für eine Blutabnahme bereit. Als Vergleich für die genetische Analyse dienten drei Blutproben von Männern, die zuvor in der Probandengruppe an der Studie teilgenommen hatten. Die Proben wurden sofort nach erfolgter Abnahme tiefgefroren und gesammelt an das genetische Labor des Instituts für Zellphysiologie der Ruhruniversität Bochum geschickt, wo die Proben untersucht wurden.

2.8.1. Experimenteller Ansatz

Durch die Genotypisierung sollte untersucht werden, ob es eine Korrelation von Mutationen oder Polymorphismen im OR1D2-Gen zu den beobachteten Phänotypen gibt. Die Sequenz des OR 17-4 Gens der Versuchspersonen sollte bestimmt und mit bekannten Sequenzen verglichen werden (siehe 1.7, Datenbank dbSNP).

Experimentell wurden folgende vier Schritte durchgeführt:

1. Isolierung von genomischer DNA aus Blut
2. PCR-Amplifikation des OR17-4 Gens und gelelektrophoretische Isolierung des entstandenen DNA-Fragments
3. Sequenzierung des isolierten OR17-4 Gens
4. Analyse der DNA-Sequenz

Eine schnelle Methode, Mutationen aufzuspüren, ist die direkte Sequenzierung PCR-amplifizierter genomischer DNA. Der typischerweise 1 kB lange Leserahmen von Geruchsrezeptorgenen liegt vollständig auf einem Exon und kann deshalb in einem einzigen Stück amplifiziert werden. Für die Genotypisierungsversuche wurden aus dem Blut der 8 Spender und 3 Kontrollpersonen genomische DNA isoliert. Von vorherigen Untersuchungen des Rezeptors konnten entwickelte Primer verwendet werden (P1 und P2 siehe 2.8.5). Mit Hilfe dieser Primer wurde der komplette Leserahmen zusammen mit ca. 50- 100 Basenpaaren der flankierenden Sequenz aus dieser genomischen DNA amplifiziert und die 1,1 kB großen PCR-Fragmente gelelektrophoretisch gereinigt und aus dem Agarosegel isoliert. Die isolierten

DNA-Fragmente wurden mit den Primern P1-P4 durch einen hausinternen Service des Lehrstuhls für Zellphysiologie der Ruhruniversität Bochum sequenziert.

2.8.2. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Materialien

Für die Agarosegelelektrophorese wurden 50 Mischungen aus 242 g Tris, 57 ml Borsäure, 100ml EDTA (500 mM, pH 8,0) und 1000 ml H₂O verwendet. Desweiteren 10.000 Mal Ethidiumbromid-Lösung (10 mg x 10¹, Serva), Laufpuffer und 5 Mal DNA- Probenpuffer bestehend aus 7,5% (v/v) Ficoll, 0,1% (w/v) Bromphenol-Blau und 0,1% (w/v) Xylencyanol FF und destilliertes H₂O.

Durchführung

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem horizontalen Agarosegel. Agarose ist ein Polysaccharid, das während des Abkühlungsprozesses nach Aufkochen geliert und dabei Doppelhelices bildet. Diese Doppelhelices lagern sich zu dicken Fäden zusammen und bilden eine großporige Matrix. Die DNA- Moleküle sind durch ihr Zucker-Phosphat-Rückgrat negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld durch das Gel zur Anode. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der Moleküle ab, wobei große Moleküle langsamer durch die Poren wandern als kleinere. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgrößen wurde ein Marker mit DNA-Fragmenten bekannter Größe auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden im Gel mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Mit UV-Licht (312 nm) kann der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt werden und die DNA durch Ermittlung von Licht im orange-roten Bereich sichtbar gemacht werden. Entsprechen der zu erwartenden DNA-Fragmentgrößen wurden Agarosekonzentrationen von 0,8 bis 1,2% (w/v) verwendet. Die Agarose löste sich durch Erhitzen in 1x TBE-Puffer, wurde dann mit Ethidiumbromid (0,4 µg/ml) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten wurde der zur Herstellung des Gels verwendete Puffer als Laufpuffer über das Gel gegossen. Die aufzutrennenden Proben wurden anschließend in die Geltaschen aufgetragen und die Elektrophorese bei einer Spannung von 5 bis 15 V/cm durchgeführt.

2.8.3. Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Materialien

Für die Präparation der DNA wurde Agarose (Biozym), QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) eine Silikat-Harz-Säule und Elutionslösung mit 10mM Tris (Biomol) und HCl verwendet.

Durchführung

Die Isolierung der DNA erfolgte aus einem präparativen Agarosegel. Bei dieser Gelart sind die Taschen größer als in einem analytischen Gel, wodurch mehr Probe auf das Gel aufgetragen werden kann und die DNA-Menge so erhöht wird. Unter UV- Licht (312 nm, Handlampe) wurden die entsprechenden Banden mit einem scharfen Skalpell ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Dabei wurde das Gelstück durch das chaotrope Salz im Hochsalzpuffer solubilisiert. Anschließend konnten die DNA- Fragmente an eine Silikat-Harz-Säule absorbiert werden, während andere Verunreinigungen durch Waschschriffe entfernt wurden. Durch Zugabe von 50 µl Elutionslösung (10 mM Tris/ HCl, pH 7,9) konnte die DNA von der Säule eluiert werden.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm. Eine OD 260 von 1 entspricht dabei einem DNA-Gehalt von 50 µg x ml⁻¹. Die DNA-Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

OD x Verdünnungsfaktor x 50 = Konzentration der DNA

Dicke der Küvette (cm)

Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA-Lösung durch Bestimmung der Ratio OD 260/ OD 280 überprüft. Eine Ratio von 1,8 entspricht einer reinen DNA-Lösung.

2.8.4. DNA- Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch einen Service des Lehrstuhls für Molekulare Neurobiochemie der Ruhr-Universität Bochum. Als Sequenzier-Automat wurde der ABI-3130xl-Sequencer eingesetzt. Methodisch wurde nach dem modifizierten Didesoxyverfahren nach Sanger aus dem Jahre 1977 vorgegangen (Sanger et al., 1992).

Dieses Verfahren basiert auf der enzymatisch katalysierten Synthese von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, wobei die Reaktionsprodukte mittels fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden nachgewiesen werden. Neben den Standardprimern (T7, SP6) können auch eigene Sequenzprimer verwendet werden. In diesem Fall wurden die Primer 3 und 4 nur zum Sequenzieren genutzt (P3: TGATGGCATATGACCGCTATGTG; interner Name: #512-17-4-450-fw, P4: GGAAAGGAGTAAGATACAGAGC; interner Name #506-17-4seq450rv).

Die Primer 1 und 2 dagegen wurden sowohl bei der Sequenzierung als auch bei der im folgenden beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion verwendet (P1: CCACATATCTA-TATGCTGTCTCTG; interner Name: #452-17-4-100 , P2: CTTCATGTTTTTATTCAA-TTAAGGAC; interner Name: #500-17-4-50).

2.8.5. Isolierung genomischer DNA aus Blut nach dem 'QIAamp DNA Mini Kit Tissue Protocol' (Qiagen)

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden 200 µl Blut in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl Proteinase K und die Inkubation der Mischung für 2 Stunden bei 55°C in einem Thermoblock. 4 µl RNase A (100mg/ml) wurden zugeführt und das Gemisch für weitere 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl AL- Puffer erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min bei 70°C und eine einminütige Zentrifugation, um die Gewebetrümmer von der DNA-Lösung zu trennen. Die Zentrifugation fand mit dem Gerät Centrifuge 5415 C von Eppendorf statt. Die wässrige Lösung wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl EtOH (96 - 100%) versetzt. Danach erfolgte die Applikation der DNA-enhaltenden Lösung auf eine Spin-Säule. Die Säule wurde 1 min bei 6.000 g zentrifugiert und anschließend in ein neues Sammelröhrchen überführt. Nun wurden 500 µl AW1-Waschpuffer auf die Säule aufgetragen und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der letzte Waschschrift erfolgte durch Zugabe des AW2-Waschpuffers und einer Zentrifugation von 3 min bei 14.000 g. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein 2 ml Reagenzgefäß überführt. Die Elution der DNA geschah durch Zugabe von 50 µl AE-Elutionspuffer bei einer ein minütigen Zentrifugation bei 6.000 g. Zur Erhöhung der DNA- Konzentration kann der letzte Schritt wiederholt werden, was auch genutzt wurde.

2.8.6. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode zur Amplifizierung definierter DNA- Fragmente. Als Templates wird genomische DNA eingesetzt (Mullis et al., 1986). Für die Synthese

der DNA-Fragmente wurde die thermostabile Taq-Polymerase (Invitrogen) und die Primer 1 und 2 (siehe DNA-Sequenzierung) verwendet. Die PCR-Reaktionen werden in Thermocyclern durchgeführt, in denen die Temperaturwechsel von Denaturierung, Annealing und Elongation automatisch gewechselt werden. Der Reaktionsansatz zur Amplifizierung der DNA hatte folgende Zusammensetzung:

PCR-Ansatz

Template gen. DNA (300 ng) 1µl

Primer 1 (100 pmol/µl) 0,3µl

Primer 2 (100 pmol/µl) 0,3µl

10x PCR-Puffer 5µl

MgCl₂ (50 mM) 3µl

dNTPs (25 mM) 0,4µl

Aqua dest. auf 49,75 µl auffüllen

Taq-Polymerase (5U/µl) 0,25µl

Die PCR-Reaktionen zur Genotypisierung des OR1D2-Gen wurden unter Standardbedingungen mit dem PCR Thermal Cycler T Gradient (Biometra) durchgeführt:

Denaturierung	5 min	94 °C
Denaturierung	1 min	94° C
Annealing	1 min	65°C
Elongation	1 min	72°C/ 35 Zyklen
Postelongation	10 min	72 °C
Pause		4 °C

Tabelle 3: PCR Ansatz

Nach Beendigung der Reaktion kühlte der Thermocycler die Proben bis zur Entnahme auf 4°C. Im Anschluss wurden 1/10 des Volumens der PCR-Ansätze zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und analysiert. Bei einem positiven Ergebnis wurde der Rest der Ansätze auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und die DNA präparativ aufgereinigt.

2.9. Statistische Analysemethoden

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der R Software (Version 2.15.0; R Foundation for Statistical Computing, Wien, Österreich). Angaben zur deskriptiven Statistik erfolgten als arithmetisches Mittel +/- Standardabweichung.

Multivariate Varianzanalysen nach dem allgemeinen linearen Modell dienten der Erkennung eines möglichen Einflusses von Infertilität auf die abhängige Variable Geruchsschwelle für Phenylethylalkohol, Bourgeonal und Helional. Ebenso wurde dies für den Faktor Alter überprüft.

Um die Frage zu klären, ob auftretende Mittelwertunterschiede sich mit zufälligen Schwankungen erklären ließen oder signifikante Unterschiede darstellten, wurden Vergleiche mit dem t-Test für unabhängige Stichproben (t-Test nach Student) durchgeführt. Es wurde getestet, ob sich die beiden Gruppen bezüglich ihrer Mittelwerte für Alter, Ergebnis des Sniffin' Stick Screening-Tests, der Schwellen und subjektiven Intensitätseinschätzung der Duftstoffe Bourgeonal, Helional und Phenylethylalkohol signifikant voneinander unterschieden.

Box-and-Whisker-Plots zur vergleichenden Darstellung numerischer Daten beinhalteten Median und Grenzen entsprechend der 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum der Werte. Als Ausreißer wurden Werte interpretiert, die mehr als 1,5 jedoch weniger als 3 Boxlängen unter- bzw. oberhalb der 25. bzw. 75. Perzentile lagen.

Das Signifikanzniveau wurde bei allen Analysen auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Deskriptive Statistik

Insgesamt wurden 39 Männer in die Studie aufgenommen, davon 17 Patienten und 22 Probanden. Zwei Männer der Patientengruppe konnten bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da sie die Einschlusskriterien im Verlauf der Studie nicht erfüllten.

Bei einem Paar ließ sich nach erneuter gynäkologischer Diagnostik der Partnerin eine Endometriose feststellen, die als Grund für eine Infertilität in Erwägung gezogen werden musste. Beim zweiten Patienten stellte sich noch während der Durchführung der Studie eine Schwangerschaft der Partnerin ein. Die Daten von 37 Teilnehmer flossen in die statistische Auswertung ein (15 Patienten, 22 Probanden). Trotz geringer Fallzahl repräsentiert die Patientengruppe in etwa die Patientenanzahl der andrologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Dresden pro Jahr, bei der eine idiopathische Infertilität als Ursache einer ungewollten Kinderlosigkeit diagnostiziert wird.

Das Alter der Patienten liegt zwischen 23 und 44 Jahren (Mittelwert 34,5 Jahre, Standardabweichung= 4,2, Standardfehler des Mittelwertes= 1,1), das der Probanden bei 30,8 Jahren im Mittel (23- 41 Jahre, SD= 5,7, SED= 0,33). Das mittlere Alter der beiden Gruppen unterscheidet sich signifikant voneinander ($t[df= 34,67]= 2,26, p= 0,03$).

3.2. Screeningtest der Sniffin' Sticks

Die Untersuchung der Identifikationsfähigkeit des Geruchssinns anhand des Screeningtests der Sniffin' Sticks wird mit dem Ergebnis der jeweils besseren Seite beurteilt. Die Patienten erreichen im Mittel eine richtige Identifikation von 10,7 Riechstiften (SD=1,28, SEM=0,33). Bei der Kontrollgruppe liegt der Mittelwert einer erfolgreichen Identifikation bei 11,2 (SD=0,73, SEM=0,16), womit kein signifikanter Unterschied vorliegt ($t[df=35]=-1,36, p=0,18$). Abbildung 3.1 verbildlicht die Ergebnisse der beiden Gruppen.

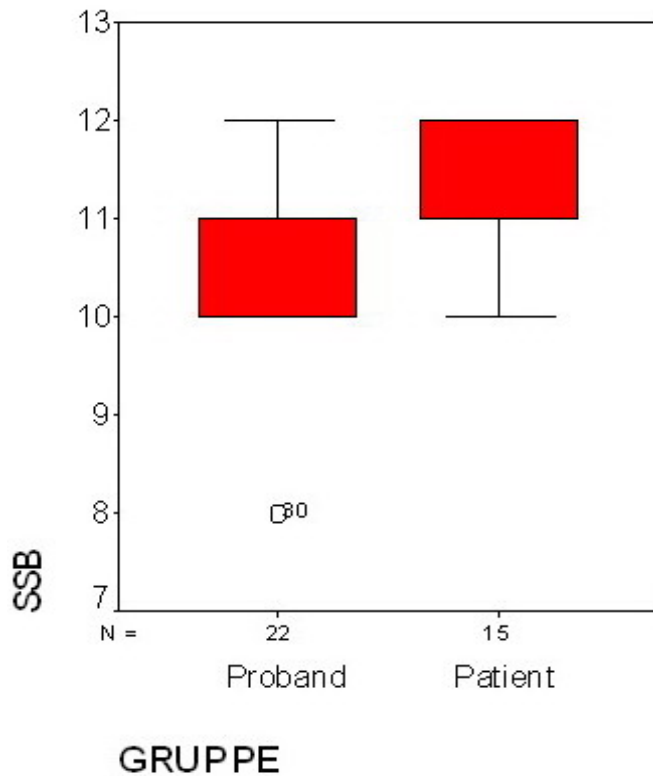


Abbildung 9: Sniffin' Sticks Screening Test

(SSB = Sniffin' Sticks Best, Ergebnis der Sniffin' Sticks der jeweils besseren getesteten Seite, Probanden versus Patienten)

3.3. Schwellen- und Diskriminationstestung

Die Varianzanalyse nach dem allgemeinen linearen Modell ergibt im Multivariate Test zum Faktor ‚Schwelle‘ und den Wechselwirkungen zu ‚Alter‘ und ‚Gruppe‘ einen signifikanten Effekt zwischen ‚Schwelle‘ und ‚Gruppe‘ ($F[df=2]=3,37$, $p=0,05$). Dagegen zeigt sich kein signifikanter Effekt zwischen ‚Schwelle‘ und ‚Alter‘ ($F[df=2]=1,49$, $p=0,25$).

Die Berechnung zum Faktor Schwelle ist nicht signifikant ($F[df=2]=2,26$, $p=0,12$). In den Testen der Innersubjekteffekte wiederholen sich die Ergebnisse für den Faktor ‚Schwelle‘ ($F[df=2]=1,72$, $p=0,19$) und die getestete Wechselwirkung zwischen ‚Schwelle‘ und ‚Alter‘ ($F[df=2]=1,12$, $p=0,33$) ohne nachgewiesenen Signifikanz. Bei der Betrachtung der Faktoren ‚Schwelle‘ und ‚Gruppe‘ wird das Signifikanzniveau mit $p=0,06$ ($F[df=2]=3$) knapp verfehlt.

Beim Test der paarweisen Vergleiche zeigt sich mit $p=0,02$ eine signifikante Differenz zwischen ‚Schwelle 1‘ (Phenylethylalkohol) und ‚Schwelle 3‘ (Helional). Wogegen sich keine Signifikanz zwischen ‚Schwelle 1‘ und ‚2‘ (Bourgeonal) ($p=1,0$) oder ‚Schwelle 2‘ und ‚3‘ ($p=0,33$) zeigt.

3.3.1. Phenylethylalkohol

Die Geruchsschwelle, bei der es zur einer erfolgreichen Diskrimination des Duftstoffes PEA durch die Probanden und Patienten kam, unterscheidet sich nicht signifikant voneinander ($t[df=35]=-1,08$, $p=0,29$). Der Mittelwert liegt in der Kontrollgruppe bei 5,3 (SD=1,44, SEM=0,31). Die Patienten erreichen einen Wert von 4,7 (SD= 1,92, SEM=0,5).

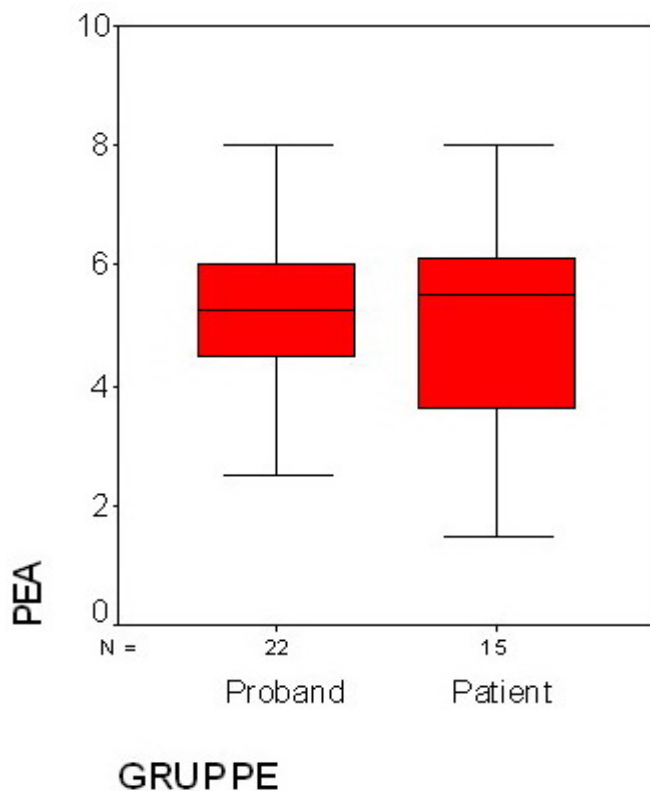


Abbildung 10: Schwellentestung Phenylethylalkohol

(PEA= in der Testung erreichte Verdünnungsstufe Phenylethylalkohol, Probanden versus Patienten)

3.3.2. Bourgeonal

Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen bei der Geruchsschwelle für die Duftsubstanz Bourgeonal feststellen ($t[df= 35]= -1,62$). Die Probanden können Bourgeonal bei einer Geruchsschwelle von 5,8 (SD=1,6, SEM=0,34) diskriminieren. Bei der Patientengruppe liegt der Mittelwert bei 4,8 (SD= 2,12, SEM= 0,55), was in Abbildung 3.3 verdeutlicht wird.

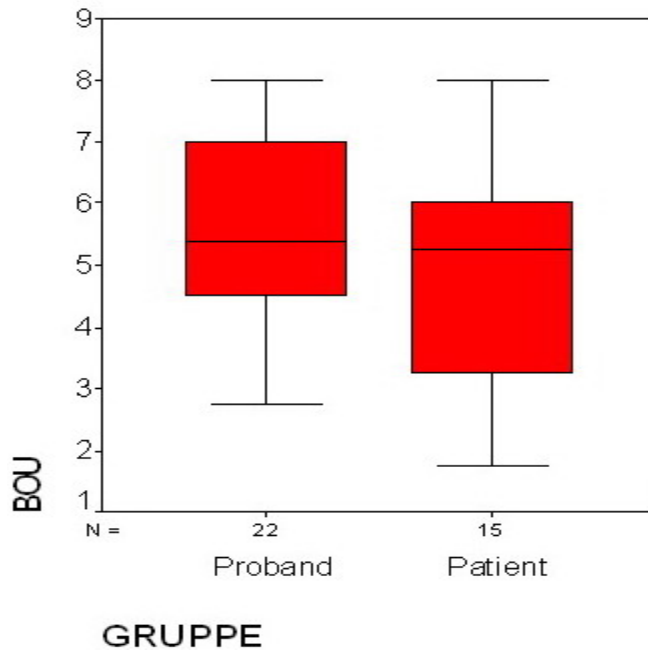


Abbildung 11: Schwellentestung Bourgeonal

(BOU= in der Testung erreichte Verdünnungsstufe Bourgeonal, Probanden versus Patienten)

3.3.3. Helional

Bei der Schwellentestung des Duftstoffes Helional zeigt sich keine Signifikanz der Mittelwerte ($t[df= 23,25]=0,69, p=0,49$). Die Probanden detektieren den Stoff ab einer Schwelle von 5,6 (SD=1,38, SEM=0,3). Bei der Patientengruppe kommt es bei einem Schwellenniveau von 6,0 (SD= 1,97, SEM= 0,51) zu einer Detektion.

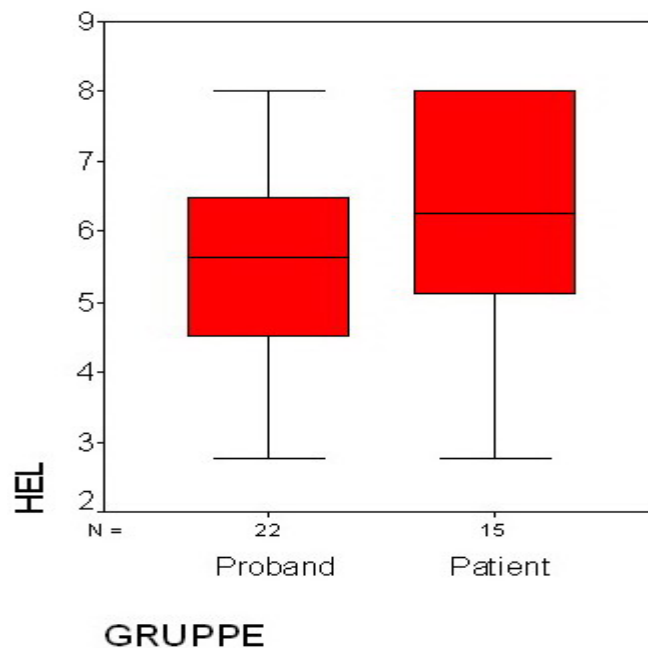


Abbildung 12: Schwellentestung Helional

(HEL= in der Testung erreichte Verdünnungsstufe Helional, Probanden versus Patienten)

3.4. Subjektive Intensitätsschätzung

3.4.1. Phenylethylalkohol

Bei der subjektiven Einschätzung der Geruchsintensität des unverdünnten Stoffes PEA legt sich die Patientengruppe im Mittel auf einen Wert von 7,9 auf einer Skala von 0 bis 10 möglichen Punkten fest (SD= 1,81, SEM= 0,47). Ein signifikanter Unterschied lässt sich bei einem Mittelwert der Kontrollgruppe von 7,4 und $p= 0,43$ ($t[df= 35]= 0,80$) zwischen den beiden Gruppen nicht feststellen.

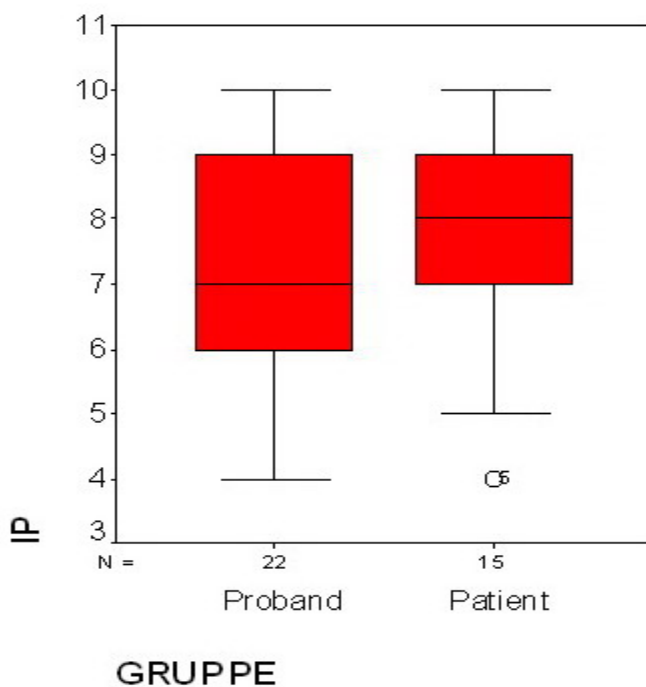


Abbildung 13: Intensitätseinschätzung Phenylethylalkohol

(IP= gewählte Intensitätsstufe auf einer Skala von 0-10, Probanden versus Patienten)

3.4.2. Bourgeonal

Es zeigt sich ein hochsignifikantes Ergebnis beim Mittelwertvergleich der beiden Gruppen in der subjektiven Intensitätsschätzung von Bourgeonal ($t[df= 35]= -3,25$, $p= 0,003$). Die Patientengruppe ordnet dem Duftstoff im Mittel einen Skalenwert von 5,9 (SD= 1,53, SEM= 0,4), die Probandengruppe dagegen einen Wert von 7,7 (SD=1,72, SEM=0,37).

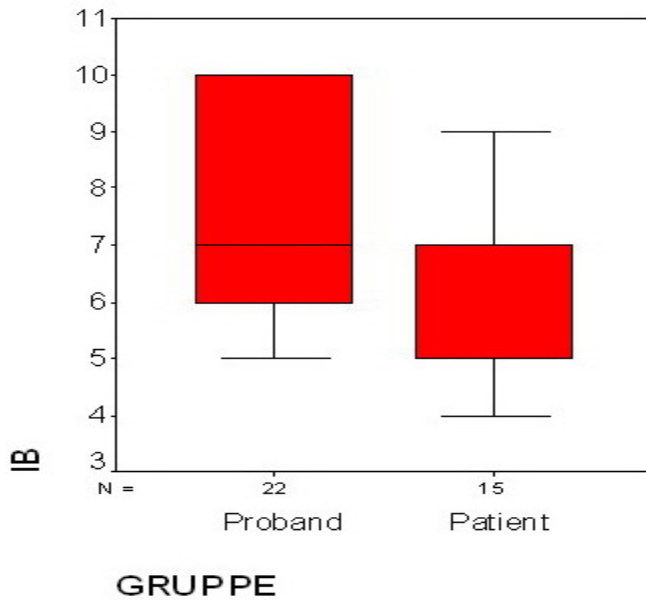


Abbildung 14: Intensitätseinschätzung Bourgeonal

(IB= gewählte Intensitätsstufe auf einer Skala von 0-10, Probanden versus Patienten)

3.4.3. Helional

Für die Substanz Helional wird keine signifikante Differenz der Mittelwerte beim Intensitätstest gefunden ($t[df= 35]= 0,09$ $p=0,93$). In der Patientengruppe wird ein Mittelwert von 6,3 mit einer Standardabweichung von 1,8 und einem Standardfehler des Mittelwertes von 0,46 ermittelt. Die Probanden schätzen die Geruchsintensität der Substanz im Mittel auf einen Skalenwert von 6,3 ein (SD= 2,21, SEM= 0,47).

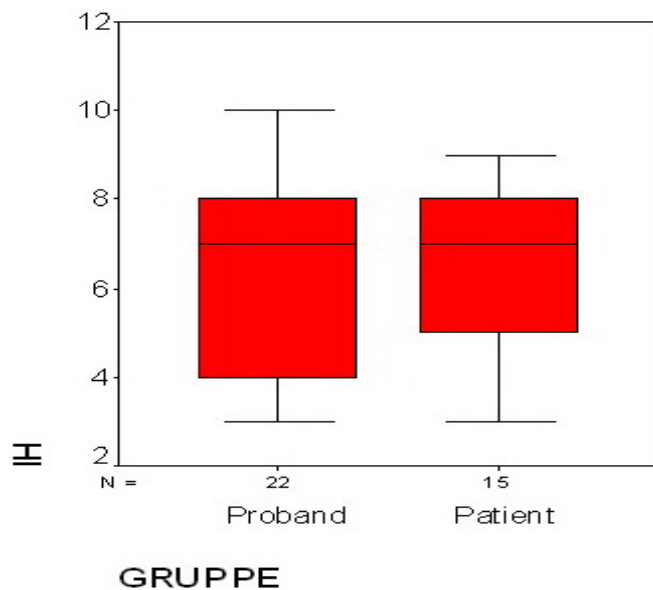


Abbildung 15: Intensitätseinschätzung Helional

(IH= gewählte Intensitätsstufe auf einer Skala von 0-10, Probanden versus Patienten)

3.5. Ergebnisse der Genotypisierung

Durch die Genotypisierung von acht Patienten und drei Kontrollpersonen konnten im Bereich der kodierenden Sequenz des OR1D2 Gens insgesamt drei Einzelnukleotidpolymorphismen nachgewiesen werden.

Die Spender waren zum Teil homozygot für die Variante G (Stelle 1), Variante A (Stelle 2), Variante C (Stelle 3) oder heterozygot an den entsprechenden Stellen. Polymorphismus 1 entspricht einer A/G Variation an Nukleotidposition 74. Die G-Variante ist die weitaus häufigere. Polymorphismus 2 stellt eine A/G Variation an Nukleotidposition 297 dar. Die A-Variante kommt deutlich öfter vor. Der dritte gefundene Polymorphismus ist eine C/T Variation an Nukleotidposition 719. Hierbei kommt die C-Variante weitaus häufiger vor.

Spender	Position 1	Position 2	Position 3
1	G	A A	G C
2	G	A	C
3	G	A	C
4	G A	G C	T
5	G	A A	G C
6	G	A	C
7	G	A	C
8	G A	G C	T

Tabelle 4: Einzelnukleotidpolymorphismen der durchgeführten Genotypisierung

3.6. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.6.1. Sniffin' Sticks

Im Screeningtest der Sniffin' Sticks ließen sich mittels t-Test für unabhängige Stichproben keine signifikanten Mittelwertunterschiede zwischen der Patienten- und Probandengruppe feststellen.

3.6.2. Schwellen- und Diskriminationstestung

Bei der Schwellen- und Diskriminationstestung der Duftstoffe Helional und Phenylethylalkohol ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen feststellen. Ebenso wenig ergab sich ein signifikantes Ergebnis bei der Testung mit Bourgeonal. Bei einer Signifikanz von $p= 0,1$ im Vergleich zu $p= 0,3$ (PEA) und $p= 0,5$ (Helional) könnte dies als Trend gewertet werden.

Die folgende Graphik fasst die Ergebnisse der Schwellentestungen für die drei Duftstoffe zusammen. 0 steht dabei für die Probanden und 1 für die Patientengruppe. Die farbliche Zuordnung der Duftstoffe ist in der Legende neben der Abbildung erläutert.

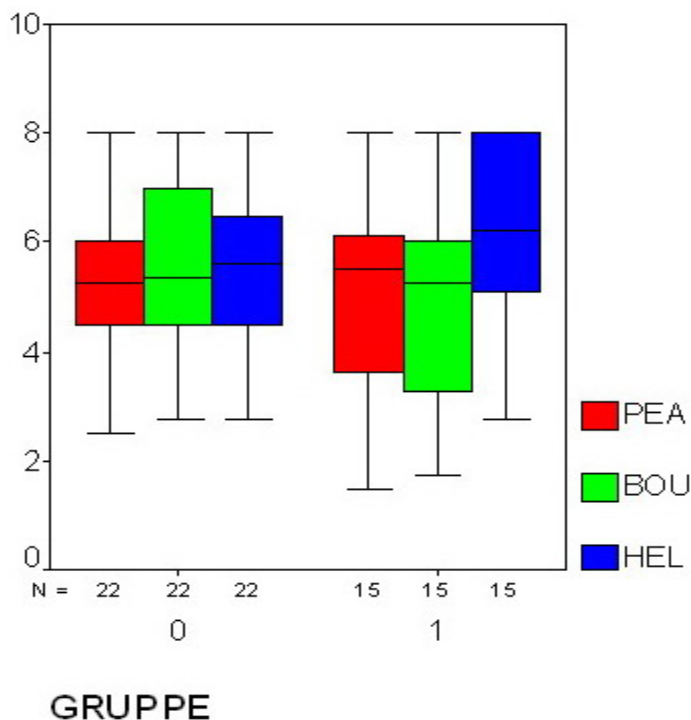
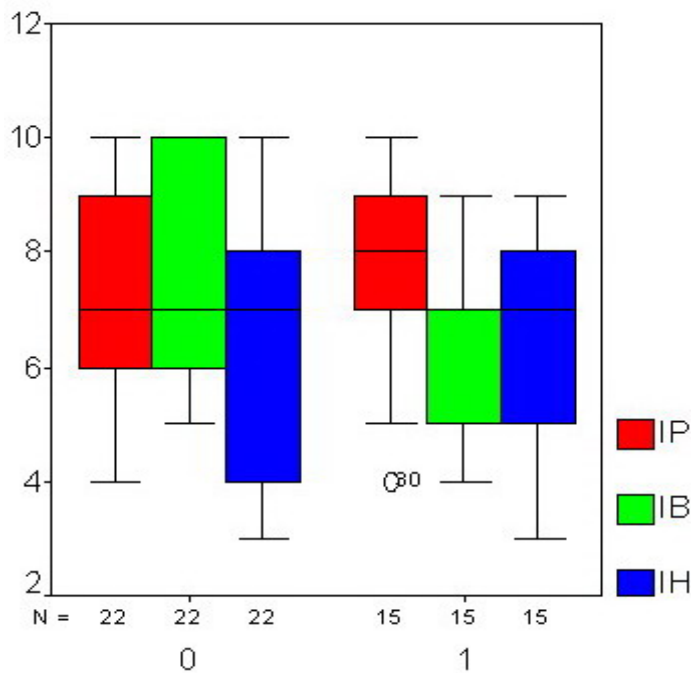


Abbildung 16: Zusammenfassung Schwellentestung

(PEA= erreichte Schwelle Phenylethylalkohol, BOU= erreichte Schwelle Bourgeonal, HEL= erreichte Schwelle Helional), 0= Probanden, 1= Patienten.

3.6.3. Intensitätsschätzung

In der subjektiven Intensitätsschätzung der Reinsubstanzen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bei den Duftstoffen Helional und Phenylethylalkohol. Bei der Einschätzung von Bourgeonal zeigte sich ein signifikantes Ergebnis ($t[df= 35]= -3,25$, $p= 0,003$). Die Patienten schätzten die Duftintensität signifikant niedriger ein als die Probanden.



GRUPPE

Abbildung 17: Zusammenfassung Intensitätseinschätzung

(IP= gewählte Intensitätsstufe Phenylethylalkohol, IB= gewählte Intensitätsstufe Bourgeonal, IH= gewählte Intensitätsstufe Helional), 0=Probanden, 1=Patienten.

3.6.4. Genotypisierung

Die Genotypisierung der kodierenden Sequenz des Geruchsrezeptors hOR 17-4 wurde bei 8 Studienpatienten und 3 Probanden der Kontrollgruppe durchgeführt. Es konnten insgesamt drei Einzelnukleotidpolymorphismen innerhalb der 11 verschiedenen DNA-Fragmente nachgewiesen werden.

```
atggatggaggcaaccagagtgaaggttcagagttccttctcctggggat
M D G G N Q S E G S E F L L L G M
```

```
gtcagagagtcctgagcagcagcagatcctggtttggatggttcctgtcca (1)
S E S P E Q Q Q I L F W M F L S
R
```

tgtacctggtcacgggtggtgggaaatgtgctcatcatcctggccatcagc
M Y L V T V V G N V L I I L A I S

tctgattccccgctgcacacccccgtgtacttcttctctggccaacctctc
S D S R L H T P V Y F F L A N L S

cttcactgacctcttctttgtcaccaacacaatccccaagatgctggtga
F T D L F F V T N T I P K M L V

acctccagtcccataacaaagccatctcctatgcaggggtgtctgacgcag (2)
N L Q S H N K A I S Y A G C L T Q
T

ctctacttctggtctccttgggtggccctggacaacctcatcctggctgt
L Y F L V S L V A L D N L I L A V
gatggcatatgaccgctatgtggccatctgctgccccctccactacacca
M A Y D R Y V A I C C P L H Y T
cagccatgagccctaagctctgtatcttactcctttccttgtgttgggtc
T A M S P K L C I L L L S L C W V
ctatccgtcctctatggcctcatacacacctcctcatgaccagagtgac
L S V L Y G L I H T L L M T R V T
cttctgtgggtcacgaaaaatccactacatcttctgtgagatgtatgat
F C G S R K I H Y I F C E M Y V
tgctgaggatggcatgttccaacattcagattaatcacacagtgctgatt
L L R M A C S N I Q I N H T V L I
gccacaggctgcttcatcttctcattcccttggattcgtgatcatttc
A T G C F I F L I P F G F V I I S
ctatgtgctgattatcagagccatcctcagaataccctcagtctctaaga
Y V L I I R A I L R I P S V S K

aatacaaagccttctccacctgtgcctcccatttgggtgcagtctccctc (3)
K Y K A F S T C A S H L G A V S L
I

ttctatgggacactttgtatggtatacctaagcccctccatacctactc
F Y G T L C M V Y L K P L H T Y S
tgtgaaggactcagtagccacagtgatgtatgctgtggtgacacccatga
V K D S V A T V M Y A V V T P M
tgaatcccttcatctacagcctgaggaacaaggacatgcatggggctctg
M N P F I Y S L R N K D M H G A L
ggaagactcctagataaacactttaagaggctgacatga
G R L L D K H F K R L T .

Abbildung 18: Lage der SNPs im Leserahmen des OR1D2-Gens

Alle gefundenen Polymorphismen sind in der SNP-Datenbank für das OR1D2-Gen beschrieben.

4. Diskussion

4.1. Riechtestungen

Alter und Fallzahl, Sniffin' Sticks

In dieser Studie wurde die olfaktorische Wahrnehmung von Duftstoffen mit dem klinischen Bild der idiopathischen Infertilität bei Männern in Verbindung gebracht.

Es zeigt sich ein signifikanter Altersunterschied zwischen Probanden und Patientengruppe. In vielen Studien ist das Alter als Einflussgröße auf die olfaktorische Leistung beschrieben. Es sind verschiedene Faktoren, die mit zunehmendem Alter eine Einschränkung der Riechwahrnehmung bedingen. Als Beispiele seien eine zunehmende Neigung zu nasalen Erkrankungen, kumulative Schäden des olfaktorischen Epithels durch virale Schädigung und andere schädigende Umwelteinflüsse, Veränderungen in Neurotransmittern und neuromodulatorischen Systemen, Zunahme an neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson genannt (Doty und Kamath, 2014). Im Screening Test der Sniffin' Sticks, welcher laut der Arbeitsgemeinschaft Olfaktologie und Gustologie der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde ein gut validierter Test für die Differenzierung zwischen Norm-, Hyp- und Anosmie ist, ergibt sich kein Unterschied der Riechleistung in den beiden Gruppen. Somit kann die Altersdifferenz in der Studie am ehesten vernachlässigt werden. In zukünftigen idealerweise multizentrisch angelegten Studien sollte dennoch eine größere Fallzahl und eine identische Altersverteilung angestrebt werden.

Bei beiden Gruppen zeigte sich ein Ergebnis, das im Bereich einer Normosmie lag. In der Studienplanung wurde der Screeningtest gewählt, da er im Vergleich zum Identifikationstest der erweiterten Testbatterie bestehend aus 16 Riechstiften mit einer Testzeit von circa 4 Minuten wesentlich schneller durchführbar ist (Hummel et al., 2001). Der Nachweis einer Normosmie schließt das Vorliegen einer spezifischen Anosmie jedoch nicht aus. Die Hypothese einer Anosmie gegenüber Bourgeonal der Infertilen als Ursache der idiopathischen Infertilität wurde in den weiterführenden Riechtestungen untersucht.

Bourgeonal

Bourgeonal ist ein synthetischer Maiglöckchenduft und aktiviert als bisher stärkster identifizierter Agonist den Riechrezeptor hOR 17-4. Aufgrund der in Untersuchungen durch Hatt und Spehr belegten Wirkungen der Substanz auf Spermien in vivo wird der Aktivierung des Rezeptors eine wichtige Rolle im Rahmen der Spermienchemotaxis zugesprochen (Spehr et al., 2006).

In einer Studie von Olsson und Laska wird die Verbindung zwischen Reproduktionsfunktion und Riechwahrnehmung hergestellt, indem die Forscher die olfaktorische Wahrnehmung von Bourgeonal zwischen Männern und Frauen vergleichen und hinterfragen. In den durchgeführten Riechtestungen zeigte sich, dass Männer im Vergleich mit weiblichen Probanden Bourgeonal in signifikant niedrigeren Konzentrationen wahrnehmen konnten. Bei den anderen in der Studie eingesetzten Substanzen Helional und n-Pentylacetat ließen sich keine geschlechterspezifischen Differenzen aufweisen (Olsson et al., 2010).

In den veröffentlichten Studien, die beide Geschlechter hinsichtlich der Riechleistung vergleichend untersuchen, fällt insbesondere ein besseres Abschneiden von Frauen bei der Identifikation von Gerüchen auf, was die Fähigkeit zur Benennung und Zuordnung von Riechwahrnehmungen beschreibt. Dies scheint an insgesamt besseren verbalen Fähigkeiten von Frauen zu liegen (Brand und Millot, 2001; Oberg et al., 2002). Überlegenheit in der Sensitivität gegenüber Duftsubstanzen war nur in einzelnen Fällen gegeben. In keiner Studie zeigten Männer eine bessere olfaktorische Leistung als Frauen (Doty und Cameron, 2009).

Die biologische Funktion einer unterschiedlichen Wahrnehmung von Männern und Frauen für spezifische Gerüche ist unklar. Der männlichen Überlegenheit in der Wahrnehmung des Botenstoffes Bourgeonal wird eine Relevanz in biologischen Verhaltensmustern zugeschrieben. Hiermit wird die Funktion von hOR 17-4 sowohl als nasal exprimierter Riechrezeptor als auch als Spermienrezeptor wie in der Studie von Spehr und Hatt unterstrichen. Eine bessere Riechwahrnehmung von Bourgeonal bei Männern könnte als Indiz eines evolutionären Prozesses gewertet werden, da die Substanz als Agonist der Riechrezeptoren auf Spermien von elementarer Bedeutung ist. Weiterführend könnte eine fehlerhafte Rezeptorfunktion negative Auswirkungen auf den Befruchtungsprozess haben (Olsson et al., 2010).

Als einen möglichen Erklärungsansatz für die phänotypische Diversität der Geruchswahrnehmung diskutieren Olsson und Laska bezugnehmend auf die Studien von Keller, Menashe und Nozawa das Vorkommen von Einzelnukleotidpolymorphismen oder DNA-Kopienzahlvariationen. Diese könnten das genetische Korrelat einer spezifischen Anosmie aber auch Hyperosmie sein (Keller et al., 2007; Menashe und Lancet, 2007; Nozawa et al., 2007).

Die Hypothese einer kompletten Anosmie der infertilen Patienten gegenüber Bourgeonal, welche sich in einem schlechten Abschneiden in der Schwellentestung des Geruchsstoffes geäußert hätte, konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Andererseits zeigt sich in der Patientengruppe eine niedrigere überschwellige Sensitivität gegenüber dem hOR 17-4 Agonisten, da sie den reinen Duftstoff als weniger intensiv einschätzen als die Vätergruppe. Diese scheint spezifisch für Bourgeonal zu sein, denn weder in den Untersuchungen zur allgemeinen olfaktorischen Identifikationsleistung noch in den Schwellen- und Intensitätstestungen für Helional und Phenylethylalkohol schneiden sie bezüglich der Sensitivität schlechter ab als die Probanden. Als Basis einer spezifischen Anosmie wird die Fehlfunktion

einer bestimmten Riechrezeptorkonstellation angesehen, denn die Verschlüsselung eines Geruches ist kombinatorisch. Dies bedeutet, dass ein normaler Duftreiz, der sich aus vielen einzelnen verschiedenen Duftkomponenten zusammensetzt, Antworten einer großen Zahl von spezifischen Sinneszellen auslöst (Hatt, 2000; Menashe et al., 2006). Eine Verbindung von Rezeptorfehlfunktion und konsekutiv mangelhafter Wahrnehmung eines Duftstoffes erscheint offensichtlicher als eine verminderte Intensitätswahrnehmung wie in dieser Studie nachweisbar.

In einer Studie von Duchamp-Viret zeigte sich, dass nach Konzentrationserhöhung eines bestimmten Moleküls von 10^{-8} mol/l auf 10^{-5} mol/l, eine Rekrutierung verschiedener Rezeptoren möglich war (Duchamp-Viret et al., 1999). Bezieht man dieses Ergebnis auf die Resultate dieser Studie, so könnte man die Vermutung aufstellen, dass OR1D2 bei überschwelligen Duftstoffkonzentrationen von Bourgeonal aktiviert wird. Einige Rezeptoren mögen bereits bei unterschwelliger Konzentration reagieren, was womöglich ähnlich in Patienten- und Probandengruppe der Fall ist, aber im Bereich hoher Konzentrationen könnte eine fehlerhafte Aktivierung des Rezeptors in einer niedrigen Intensitätswahrnehmung resultieren, so dass eine Rezeptorfehlfunktion nur bei überschwelliger Konzentration des Duftstoffes auftaucht.

In einer ähnlichen Studie von Ottaviano im Jahr 2013 zeigte die idiopathisch infertile Patientengruppe gegenüber der Probandengruppe bestehend aus fertilen Männern sowohl eine erniedrigte Riechwahrnehmung von Bourgeonal als auch eine mangelnde Reaktion von Spermienzellen auf die Duftsubstanz in vitro. Auch hier war die Fallzahl allerdings sehr gering, was in der Diskussion als Ansatzpunkt zukünftiger Studien aufgegriffen wurde (Ottaviano et al., 2013).

Phenylethylalkohol

Die Geruchsschwelle der beiden Gruppen für den Duftstoff PEA unterschied sich nicht signifikant voneinander, was für eine gleich gute Wahrnehmung der Geruchssubstanz spricht. Auch bei der subjektiven Einschätzung der Intensität der Reinsubstanz legten sich beide Gruppen auf eine ähnlich hohe Stufe fest. In den 2001 durch Hummel et al. durchgeführten Riechtestungen an 1012 Probanden, zeigten 87,5% eine richtige Identifikation des Stoffes (multiple forced choice Modus, 1 von 4 Stiften, Hummel et al., 2001). Somit liegt PEA in der Gruppe der getesteten Substanzen mit der höchsten Identifikationsrate (Leder, Fisch, Orange, Pfefferminz). Die große Familiarität des Geruchs, der rosenähnlich ist, könnte hierbei eine Rolle spielen.

Helional

Die Geruchssubstanz Helional wird als meeresbrisenartig beschrieben und wurde in den Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Hans Hatt als nicht-aktivierende Substanz für hOR 17-4

definiert. Trotz struktureller Analogien des Duftstoffes zu Cyclamal, der primär identifizierte Ligand des Rezeptors, und Canthoxal, Bourgeonal und Lilial, die später als deutlich potentere Rezeptoragonisten entdeckt wurden (Spehr et al., 2003).

In dieser Studie wurde Helional als unspezifische Substanz ähnlich wie PEA im Vergleich zu Bourgeonal getestet. In den Schwellenergebnissen zeigt sich kein Unterschied zwischen infertilen und fertilen Männern. Auch die Intensitätseinschätzung fiel ohne signifikante Differenz aus, weshalb von einer ähnlichen Riechleistung in beiden Gruppen auszugehen ist.

4.2. Genotypisierung des Riechrezeptors hOR 17-4

Die große phänotypische Diversität der menschlichen Geruchswahrnehmung kann teilweise genetischen Korrelaten wie der Variation von Kopienzahl einzelner DNA-Segmente, Alleldeletionen und Einzelnukleotidpolymorphismen zugeschrieben werden (Hasin-Brumshtein et al., 2009). Im Bereich der Chemosensorik gibt es gut charakterisierte Beispiele, bei denen SNPs die Ligandenspezifität bestimmter Chemorezeptoren modifizieren (Hasin-Brumshtein et al., 2009). Im Falle des PTC-Gens (PTC=Phenylthiocarbamid), das für den Bitterrezeptor für Phenyl-thioharnstoff kodiert, treten im Wesentlichen zwei Haplotypen auf, die sich durch drei SNPs im Leserahmen des Gens unterscheiden. Die PAV- und die AVI-Variante treten in etwa gleich häufig auf und unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit, Phenylthioharnstoff zu detektieren (Duffy et al., 2004).

Auch bei Genen für Geruchsrezeptoren sind SNP-Varianten bekannt. Beim Rezeptorgen OR7D4 kodieren zwei Varianten für Proteine, welche Androstenon unterschiedlich gut detektieren können (RT- und WM-Variante) (Keller, 2007). Androstenon gehört zur Klasse der Steroidhormone und ist ein Metabolit des Sexualhormons Testosteron. Bei verschiedenen Säugetieren dient es als Pheromon und auch beim Menschen scheint es einen Einfluss auf das Verhalten zu haben. Studien zeigen, dass die Beurteilung durch weibliche Testpersonen nach olfaktorischer Darbietung von Androsteron abhängig der jeweiligen Zyklusphase ist (Hummel et al., 1991).

Menashe und Mitarbeitern gelang der Nachweis, dass SNPs im menschlichen Riechrezeptor OR11H7P zu einer veränderten Sensitivität gegenüber Isovaleriansäure führen. Einzelnukleotidpolymorphismen können demnach auf genetischer Basis zur Diversität olfaktorischer Phänotypen beitragen und die Riechwahrnehmung individuell beeinflussen (Keller et al., 2007; Hasin-Brumshtein et al., 2009). Das Vorkommen von SNPs ist auch in kleinen Genen relativ häufig: von 10 zufällig ausgewählten Geruchsrezeptorgenen fand sich keines ohne bekannte SNPs im kodierenden Exon. Die Zahl der gefundenen Variationen lag zwischen eins und 14. Geschätzt kann man typischerweise mit etwa drei bis fünf bekannten SNPs im kodierenden Bereich von Geruchsrezeptorgenen rechnen.

In der durchgeführten Untersuchung wurden drei Einzelnukleotidpolymorphismen gefunden. Nicht alle führen zwangsläufig zu einem Austausch von Aminosäuren. Polymorphismus 1, bei dem eine A/G Variation an Nukleotidposition 74 vorliegt, kann bei einem G-A Austausch die Aminosäure Nr. 25 von R zu Q verändern. Das Vorliegen von Arginin statt Glutamin an dieser Position könnte eine Funktionsänderung des exprimierten Rezeptors bewirken. Polymorphismus 2 stellt eine A/G Variation an Nukleotidposition 297 dar. Der A-G Austausch verändert die Aminosäure Nr. 99 nicht und ist damit eine stille Mutation. Der dritte Polymorphismus ist eine C/T Variation an Nukleotidposition 719. Der C-T Austausch verändert die Aminosäure Nr. 240 von Threonin zu Isoleucin, was eine Funktionsänderung zur Folge haben könnte.

Eine genauere Einordnung der gefundenen SNPs ist anhand der SNP-Datenbank möglich. Die meisten bekannten SNP sind in dieser Datenbank katalogisiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Eine Einteilung erfolgt mittels rs-Nummern. Interessant ist hierbei, ob die nachgewiesenen SNPs bereits an bekannten Stellen auftreten und wie groß deren Häufigkeit in einer bestimmten Population ist.

Eine Suche nach SNPs im OR1D2-Gen in der SNP-Datenbank (Englisch: database SNP, dbSNP) ergibt, dass die drei durch PCR-Sequenzierung ermittelten SNPs bereits bekannt sind. Polymorphismus 1 entspricht rs 769423. Für diesen Polymorphismus liegt eine Analyse der Populationsverteilung vor. Die in der Studie vorkommende Verteilung passt gut zu dieser Auflistung. Gleiches gilt für Polymorphismus 2, der als rs 769424 in der Datenbank gelistet ist. Polymorphismus 3 findet sich als rs 4300683. Eine Analyse der Populationsverteilung liegt vor. Für Europäer ist die C-Variante mit 95-100% die Häufigere. In unserer Analyse tritt die T-Variante, welche bei Europäern mit 0-5% eher selten vorkommt, verhältnismäßig häufig auf.

Zusammenfassend liefert die Analyse der genomischen PCR-Fragmente ein SNP-Muster, das sich zwischen Kontrollgruppe und Probandengruppe im Wesentlichen nicht unterscheidet. In beiden Gruppen findet sich ein teilweise identisches Muster. Vier der acht Patienten mit verminderter Bourgeonalwahrnehmung haben eine OR1D2-Gensequenz, welche der weltweit Häufigsten entspricht. Alle drei in der vorliegenden Studie gefundenen SNP-Positionen waren bereits bekannt und keine dieser Variationen ist ausgesprochen selten. Eine Korrelation zwischen SNP-Mustern und dem beobachteten Phänotyp ist also nicht feststellbar. Die Studienergebnisse schließen nicht aus, dass SNPs im OR1D2-Gen zu einer Modifikation der Bourgeonalperzeption führen können. Die gefundenen SNPs an Position 1 und 3 bewirken einen Aminosäureaustausch von R zu Q (Variante 1) oder von T zu I (Variante 3), so dass sie zu einer Funktionsveränderung des Geruchsrezeptors führen könnten. Die SNP an Position 2 ist für die Funktion wahrscheinlich irrelevant, da die kodierte Aminosäure keiner Änderung unterliegt.

Ottaviano und Mitarbeiter analysierten das OR1D2-Gen neun infertiler Männer und von 15 Kontrollpersonen hinsichtlich 13 vorkommender SNPs. Es zeigte sich ein statistisch häufigeres Vorkommen von Allel und Genotyp rs 769423 unter den Infertilen. Ebenso zeigte die Patientengruppe eine geringere Geruchsschwelle bei der Detektion von Bourgeonal und eine geringere Reaktion von Spermien auf die Geruchssubstanz in vitro im Vergleich zu den fertilen Probanden, weshalb eine Bedeutung von OR1D2 und dessen genetischer Beschaffenheit im Rahmen der Befruchtung postuliert wird (Ottaviano et al., 2013).

Es ist möglich, dass die selteneren Varianten des Rezeptorproteins Bourgeonal schlechter wahrnehmen können. In der Studie kommen für diese Allele nur heterozygote Probanden vor, welche somit auch das häufigere, garantiert funktionelle, Allel haben. So könnte es sein, dass der Phänotyp möglicherweise nur schwach ausgeprägt ist. Interessant wären demnach Probanden, die homozygot für die seltenen Allele sind. Die gezielte Suche und Testung homozygoter Probanden für seltene Allele wäre ein sinnvoller Ansatz für eine zukünftige Studie. Zur Identifikation solcher Probanden wäre eine schnelle Methode zur Untersuchung solcher SNPs in größeren Populationen notwendig. Eine Möglichkeit stellen SNP-DNA-Chips dar, die kostengünstig eine parallele Analyse von allen bekannten SNPs (ca. 5.000) in Chemorezeptorgenen (ca. 500) in einem einzigen Experiment ermöglichen. Durch diese Vorgehensweise könnte man vererbte chemosensorische Phänotypen deutlich leichter zu einem Gen korrelieren, da man nicht von der Kenntnis eines einzelnen Kandidatengens abhängig ist.

4.3. Die Bedeutung von hOR 17-4 für Fertilität und Reproduktionsmedizin

Idiopathische Infertilität

Nach Schätzungen der WHO sind weltweit 50 Millionen Paare von Fertilitätsstörungen betroffen. Bei etwa 40% der Erkrankten sind die Ursachen auf Seiten des Mannes zu finden. Häufig liegt die männliche Infertilität in einer minderwertigen Qualität der Spermien begründet. Klammert man die Gruppe aus, bei der Störungen der Morphologie und Beweglichkeit der Spermien diagnostiziert wird, verbleiben zwischen 10 und 20% der Männer, bei denen die klinisch relevanten Parameter der Spermien im Normbereich liegen, deren Partnerinnen fertil sind und bei denen trotz regelmäßigem, ungeschütztem Geschlechtsverkehr nach einem Zeitraum von 12 Monaten oder mehr keine Schwangerschaft eintritt (Isaksson und Tiitinen, 2004). So bleiben 15% der Paare in westlichen Ländern der Welt ungewollt kinderlos (Gurunath et al., 2011).

In der Andrologischen Ambulanz des Universitätsklinikums Dresden werden pro Jahr um die 100 Patienten mit unerfülltem Kinderwunsch betreut. 40% der Männer zeigen pathologische

Befunde in den erstellten Spermogrammen, die als Ursache einer Infertilität in Frage kommen. Einzelne definierte Ursachen (beispielsweise das Vorliegen einer Varikozele) kommen in circa 10% vor. Es verbleiben 20% der Patienten, bei denen keine Ursache der Unfruchtbarkeit bestimmt werden kann. Die Zahl deckt sich gut mit der in der Literatur beschriebenen Prävalenz der idiopathischen Infertilität (Ko et al., 2012).

Spermienchemotaxis

Bedenkt man das teilweise bevorzugte Auftreten bestimmter Riechrezeptoren in spermato-genen Zellen und deren potentielle Bedeutung für die Navigation menschlicher Spermien, so könnte hier ein neuer Ansatz zur Klärung der idiopathischen Infertilität liegen. Defekte in Strukturen oder dem Repertoire der olfaktorischen Rezeptoren auf Spermien könnten zu Schwierigkeiten in chemotaktischen Prozessen führen und eine erfolgreiche Befruchtung verhindern. Genau ist bisher nicht im Einzelnen verstanden, welche Mechanismen hinter einem erfolgreichen Zusammentreffen der Geschlechtszellen stehen. Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte legen ein multifaktorielles Geschehen nahe und vieles deutet auf eine fein aufeinander abgestimmte Interaktion von Eizelle und Spermien, vielmehr als eine rein zufällige Kollision der Gameten, hin (Suarez, 2002; Eisenbach und Giojalas, 2006). Ein thermotaktischer Prozess scheint einer chemotaktischen Kommunikation vorauszu-gehen. Vermutlich werden die reifen Spermien zur wärmeren und Befruchtung bereitstehenden Eileiterseite ‚gelockt‘ (Bahat, 2010).

Die chemotaktische Kommunikation zwischen Eizelle und Spermien ist ein weitverbreitetes Phänomen, welches bei verschiedensten Lebensformen von niederen Pflanzenarten bis hin zu Säugetieren beobachtet werden kann und eine entscheidende Rolle zur Sicherstellung eines erfolgreichen Befruchtungsvorgangs spielt. Freigesetzte Botenstoffe fungieren als richtungweisende Signale für den Weg zur Eizelle der eigenen Spezies. Insbesondere bei marinen Invertebraten mit externer Fertilisation ist eine Speziesspezifität im Rahmen der Chemotaxis häufig zu beobachten und Rassenkreuzung kann verhindert werden (Yoshida et al., 1993).

Bei Säugetieren weist die Chemotaxis der Geschlechtszellen Unterschiede auf. Die Eizelle scheint nicht direkte oder alleinige Quelle der freigesetzten Lockstoffe zu sein, sondern ihr Ursprung wird der Follikularflüssigkeit und den die Eizelle umgebenden Cumuluszellen zugesprochen. Einige Studien deuten darauf hin, dass beim Menschen nur eine Subpopulation der Spermien chemotaktische Verhaltensweisen zeigen. Diese reagierenden Spermien haben gemein, dass sie die Kapazitation bereits durchschritten haben (Cohen-Dayag et al., 1995). So wird die Hypothese aufgestellt, dass diese Assoziation den Hinweis darauf geben könnte, dass die physiologische Funktion von Spermienchemotaxis in vivo nicht sein könnte, mög-

lichst viele Spermien zur Eizelle zu geleiten, sondern genau den Anteil zu rekrutieren, der nach erfolgter Kapazitation für eine limitierte Zeit zur Befruchtung bereitsteht (Cohen-Dayag et al., 1995). Spehr und Mitarbeiter konnten dagegen keine Korrelation von Kapazitation und Chemotaxis bestimmter Spermienuntergruppen feststellen (Spehr et al., 2003; Spehr et al., 2004). Bei Nicht-Säugetieren scheint die physiologische Aufgabe der Chemotaxis dagegen zu sein, eine möglichst hohe Anzahl an Geschlechtszellen ohne eine spezielle Selektion zur Eizelle zu leiten (Yanagimachi et al., 1992).

Die zugrunde liegenden Mechanismen der Spermienchemotaxis scheinen aber artenübergreifend identisch zu sein. Entscheidend scheint hierbei das intrazelluläre Calciumniveau. Die jeweiligen Rezeptorliganden führen zu einem Einstrom extrazellulären Calciums nach intrazellulär und bewirken so, nach Induktion verschiedener Signaltransduktionskaskaden, eine Modulation der flagellaren Bewegungsmuster (Yoshida et al., 2010). Bioassays, die im Rahmen der Identifikation und Charakterisierung von hOR 17-4 durchgeführt wurden, konnten die Reaktionen von Spermien auf Bourgeonal darbieten (Spehr et al. 2003). Mit zunehmender Duftstoffkonzentration kam es zu einer deutlichen Zunahme der Schwimmgeschwindigkeit, hyperaktiven Geißelschlagmustern und charakteristischen Umkehrbewegungen in Richtung der Duftstoffquelle, die im Englischen auch als „chemotactic turn“ bezeichnet werden.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Dosisabhängigkeit der beobachteten Reaktionen. Bei einer Konzentration von 10^{-9} M zeigten Spermien keine chemotaktische Bewegung in Richtung Bourgeonal. Bei 10^{-8} M dagegen bewegen sich die Zellen schneller und zielgerichteter zum Ort der höheren Duftstoffkonzentration, weshalb hier von einer erreichten notwendigen Schwellenkonzentration ausgegangen werden kann. Bei einer eingesetzten Konzentration von 10^{-6} M konnte bei der Mehrzahl der Geschlechtszellen typische Bewegungsmuster detektiert werden (Spehr et al., 2006). Dies bedeutet, dass die Schwellenkonzentration um das 100-fache überstiegen werden muss, um eine vollständige und effektive Verhaltenssequenz bei der Mehrzahl der Spermien in der chemotaktischen Gameteninteraktion sicherzustellen. Bezogen auf die Hypothese dieser Studie kann somit postuliert werden, dass obwohl in einer physiologischen reifen Spermienpopulation ein gewisses Konzentrationsniveau des Rezeptorliganden zu einer kompletten Aktivierung chemotaktischen Verhaltens führt, dieses gleiche Dosisniveau eventuell bei pathologisch veränderten Zellen zu keiner suffizienten Chemotaxis ausreicht.

Die Frage wo und wann Spermien den Botenstoff detektieren ist ungeklärt. Auffällig ist der breite dynamische Wahrnehmungsbereich, da Spermien auf Konzentrationen zwischen 10^{-12} bis 10^{-6} M Reaktionen zeigen. Der Zeitpunkt der Kapazitation von Spermien und deren Freisetzung aus ihrer Warteposition im Eileiter scheint auf die Verfügbarkeit der Eizelle abgestimmt zu sein (Giojalas et al., 2004). Auch ist auffallend, dass in der Ampulle des ovulierenden Eierstocks eine signifikant größere Anzahl an Spermien vorgefunden wird als im Eileiter

der kontralateralen Seite (Williams et al., 1993). Diese Tatsachen deuten darauf hin, dass sich Spermien in einem dynamischen Dialog mit ihrer Umgebung befinden.

Auch andere auf Spermien exprimierte Riechrezeptoren sind im Gespräch im Rahmen der Chemotaxis eine Rolle zu spielen und auf unterschiedliche Geruchssubstanzen zu reagieren. Der von mehreren Autoren beschriebene, ionotropische ChatSper Kanal wird beispielsweise durch Progesteron und Prostaglandine aktiviert (Strünker et al., 2011). In einer neueren Studie konnte eine Reaktion desselben Rezeptors auf Bourgeonal und Undecanal nachgewiesen werden (Brenker et al., 2012).

Kandidaten für potentielle Liganden der testikulären OR

Die Sekretion richtungsweisender Komponenten unmittelbar am Ort der Befruchtung wird ebenso wie die Bedeutung als Navigationsfaktor der Spermien für den gesamten Weg durch den weiblichen Genitaltrakt diskutiert (Eisenbach, 2004). Offensichtlich scheinen die Rezeptoraktivierungen nicht nur einen Einfluss auf das Bewegungsmuster von Spermien zu haben, sondern zudem essentielle Reaktionen wie die Kapazitation und Akrosomenreaktion zu bedingen (Yanagimachi, 2011).

Die synthetisch hergestellten Duftstoffe Bourgeonal, Cyclamal oder Lylal repräsentieren vermutlich keine endogenen Liganden testikulärer Riechrezeptoren, sondern dienen lediglich als chemische Schablonen, um die strukturellen Voraussetzungen einer potentiell aktivierenden Substanz nachvollziehen zu können. Verschiedene Stoffe werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Obwohl das Phänomen der Chemotaxis von Spermien und Eizelle bei vielen Pflanzen und Tierarten gut verstanden ist, hinkt die Identifikation der Botenstoffe hinterher. Die ersten identifizierten Lockstoffe wurden bei Pflanzenarten beschrieben (Brokaw, 1958). Im Tierreich konnte bei mehreren Nicht-Säugetieren eine genaue Zuordnung von Spezies und chemischem Botenstoff erfolgen. Hier handelt es sich zum Großteil um Peptide, Proteine oder Aminosäuren, teilweise Komponenten mit geringem Molekulargewicht (1-20 kDa) (Rifell et al., 2002; Böhmer et al., 2005; Guerrero et al., 2010).

Eine Reihe von in der weiblichen Follikularflüssigkeit detektierten Botenstoffen wurden als mögliche Liganden präsentiert, darunter atriales natriuretisches Peptid (ANP), Progesteron, n-formylierte Peptide und das von Granulosazellen präovulatorischer Follikel exprimierte Chemokin RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted chemokine) (Eisenbach, 1999; Isobe et al., 2002). Sliwa erwähnt in einer Untersuchungsserie Heparin, Adrenalin, Oxytocin, Calcitonin und Acetylcholin, doch scheint es sich bei der kritischen Betrachtung der Untersuchungstechniken eher um Hyperaktivierung und Einfangen der Zellen als um Chemotaxis zu handeln (Sliwa, 1995). Progesteron, welches seine Quelle in Zellen des Cumulus oophorus haben soll, wurde in mehreren Studien als ein entscheidender Botenstoff der Spermienchemotaxis beim Menschen beschrieben, obwohl das Hormon vielerorts

im weiblichen Genitaltrakt vorkommt (Teves et al., 2009) und auch Gegenstimmen in der aktuellen Literatur vorkommen. Die Vielzahl der auf Spermien vorkommenden G-Proteingekoppelten Rezeptoren ist ein deutliches Argument, das hier interagierende Substanzen in die Chemotaxis involviert sind. Ein Nachweis physiologischer Liganden ist bis dato jedoch noch nicht gelungen (Yoshida und Yoshida, 2011).

OR und ihr gezielter Einsatz im Rahmen von Infertilität und Kontrazeption

Nach erfolgreicher Identifikation physiologisch vorkommender Kandidaten solcher Duftstoffe im weiblichen Genitaltrakt ließe sich bei gezieltem Einsatz möglicherweise der Befruchtungsprozess positiv oder negativ beeinflussen. Dies könnte ein neuer diagnostischer und therapeutischer Ansatzpunkt im Rahmen der Behandlung einer idiopathischen Infertilität sein. Die Anwendung pharmakologischer Modulatoren der Riechrezeptoren könnte beispielsweise einen therapeutischen Gewinn in der Reproduktionsmedizin darstellen. Eine Ergebnisverbesserung von In-vitro-Fertilisationen, die mit einer Erfolgsrate von circa 40% immer noch mehr als unbefriedigend sind, wäre denkbar. Andererseits sind diese Erkenntnisse auch für die Kontrazeption von großem Interesse. Ein gezielter Einsatz olfaktorischer Substanzen oder deren Antagonisten als alternative Kontrazeptiva, die weder in den sensiblen weiblichen Hormonstoffwechsel eingreifen noch zellschädigende Eigenschaften besitzen, wären von enormer klinischer Relevanz (Spehr und Hatt, 2005). In diesem Zusammenhang ist die Identifikation des Antagonisten von Bourgeonal interessant. Es konnte gezeigt werden, dass die Substanz Undecanal zu einer kompletten Blockade der Rezeptorantwort von OR1D2 führt und ein kompetitiver Antagonismus der beiden Substanzen wird als zugrundeliegender Mechanismus angenommen (Spehr et al., 2003).

Trotz dieser vielversprechenden Ansätze müssen diese „in vitro“ erlangten Erkenntnisse vorerst der Übertragbarkeit in eine „in vivo“ Situation standhalten.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der Erforschung der Riechrezeptoren und deren molekularen Funktionsmechanismen zeigt sich, dass ihr Vorkommen nicht auf Gewebearten reduziert ist, die eine Rolle im klassischen Riechprozess spielen. Eine Funktion im Rahmen der Zell-Zell-Kommunikation mittels Chemotaxis wird in der Literatur vielseitig diskutiert. Die Expression olfaktorischer Rezeptoren in der Spermatogenese und auf reifen Spermien, lässt eine physiologische Funktion vermuten. Insbesondere eine molekulare Steuerung des menschlichen Befruchtungsprozesses wird kontrovers diskutiert. Sollten die auf Spermien exprimierten Riechrezeptoren das Zusammentreffen der Gameten ermöglichen, so ist eine fehlerhafte Rezeptorfunktion als Ursache für Fertilitätsstörungen denkbar. Der Riechrezeptor hOR 17-4 konnte im Riechepithel und auf Spermien nachgewiesen werden. Eine Rezeptorfehlfunktion würde demnach auch in einer verminderten olfaktorischen Leistung bezüglich der entsprechenden Liganden resultieren. Der Nachweis einer funktionellen Anosmie für Bourgeonal, der identifizierten Substanz mit der stärksten Rezeptorantwort, wäre in Riechtestungen möglich.

In der vorliegenden Studie wurden die Erkenntnisse über den nasal und testikulär exprimierten Riechrezeptor hOR 17-4 in einen klinischen Zusammenhang gebracht. Es sollte dessen Funktion anhand von Riechtestungen bei idiopathisch infertilen männlichen Patienten untersucht und im Vergleich zu fertilen Männern bewertet werden und die Hypothese einer gestörten Rezeptorfunktion als Ursache einer idiopathischen Infertilität überprüft werden. Im zweiten Teil der Studie wurde der Rezeptor bei einzelnen Männern aus Patienten und Probandengruppe genetisch analysiert, um gezielt möglicherweise bestehende Polymorphismen oder anderweitige genetische Korrelate für eine verminderte olfaktorische Leistung gegenüber Bourgeonal aufweisen zu können.

Die Ergebnisse deuteten zwar nicht auf eine Anosmie der Patienten gegenüber Bourgeonal hin, jedoch zeigte sich eine niedrigere Intensitätswahrnehmung der Geruchssubstanz durch infertile Männer, die spezifisch für den Duftstoff war. Alle anderen untersuchten Substanzen wurden gleichwertig von Probanden- und Patientengruppe detektiert.

Molekulargenetisch zeigten sich einige Polymorphismen, die aus Voruntersuchungen bereits bekannt waren. Insgesamt konnte kein eindeutiges genetisches Korrelat für eine verminderte Bourgeonalperzeption bei den Patienten nachgewiesen werden. Die lediglich exemplarische Fallzahl ist hier sicherlich zu berücksichtigen.

Noch sind die sich mit diesem Thema befassenden Studienergebnisse nicht in einen physiologischen Kontext zu übertragen, da insbesondere die Identifizierung potentieller Liganden im weiblichen Genitaltrakt aussteht. Doch stellen die bisher erlangten Erkenntnisse eine Basis zur Weiterentwicklung von Diagnostik- und Therapieansätzen im Bereich der idiopathi-

schen Infertilität, hormonfreien Kontrazeption und In-vitro-Fertilisation als auch zur Entwicklung neuer olfaktorischer Untersuchungen im Rahmen andrologischer Diagnostik dar.

Summary

The identification of olfactory receptor expression in different tissues than olfactory epithelium prepared the ground for a discussion about a potential role in cell-cell communication via chemotaxis. Especially the finding of olfactory receptors on the flagellar midpiece of human spermatogenic cells led to a debate about a link between OR activation and sperm motility. A chemotactic guidance of sperm cells towards the egg could ensure fertilization and thus in the reverse case could cause infertility in receptor function deficiency.

Odorant receptor hOR 17-4 (or OR1D2) was found to be expressed in both olfactory epithelium and sperm cells. The receptor was shown to be activated by bourgeonal ("lily of the valley" odor) and is inhibited by undecanal ("green leafy" odor). A receptor dysfunction in the nose might entail also fertility problems. A functional anosmia towards bourgeonal could be detected in olfactory tests.

In this study the findings about hOR17-4 were transferred to a clinical setting. Receptor function of idiopathic infertile patients and fertile men was studied in olfactory tests and the hypothesis of a receptor deficiency causing infertility was reviewed. Recent genetic studies suggest that 2 mechanisms could explain observed variations in olfactory sensitivity among individual humans. First, the single nucleotide polymorphisms (SNPs) are believed to contribute to olfactory diversity. Furthermore, a variation in the number of copy of DNA segments (CNVs) could explain a disparity in the number of olfactory receptors and thus be correlated to various degrees of inputs toward higher neuronal levels. In order to detect possible genetic variations which might result in a deficient bourgeonal perception in the group of idiopathic infertile men a genetic analysis of hOR 17-4 from a sample of infertile and fertile men was performed.

Although the results do not show a complete anosmia of infertile patients to bourgeonal, the patients exhibit lower suprathreshold sensitivity to this odor because they perceive bourgeonal as less intense as the fertile group. This lower suprathreshold sensitivity seems to be specific to bourgeonal odorant as infertile subjects exhibit general odor identification abilities equivalent to the fertile group and do not exhibit any differences in sensitivity ("threshold" and "intensity" measurements) to the other odors tested in the study.

The analysis of SNPs of OR1D2 revealed three SNPs which are already listed on the SNP database and widespread among the European population. One of them leads to an exchange of aminoacids and could thus have an influence on olfactory perception. No specific SNP in the group of infertile men could be linked to a deficient olfactory sensitivity towards bourgeonal. Findings from different studies strongly suggest an important role of hOR17-4 in human sperm chemotaxis. However, odorants activating the receptor in vitro have not been identi-

fied in the female reproductive tract yet and chemical identity of native ligands for the olfactory receptor are as yet unknown. Identifying natural sperm chemoattractants as well as receptor antagonists may open the door to new diagnostic and therapeutic tools in male infertility treatment, hormone-free contraceptive methods, improvement of in-vitro-fertilization results and detection of infertility via olfactory tests.

6. Thesen

Die olfaktorische Wahrnehmung des Duftstoffes Bourgeonal durch fertile und infertilen Männern und Genotypisierung des Bourgeonalrezeptors hOR 17-4, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, vorgelegt von Eva Kemper, 2013

- 1) Die olfaktorische Identifikationsleistung von idiopathisch infertilen Patienten und fertilen Probanden spricht für eine Normosmie hinsichtlich der getesteten Substanzen (Sniffin' Sticks Screening Test).
- 2) Die Diskriminationsleistung und Ergebnisse für die Geruchsschwellentestung bei den Substanzen Phenylethylalkohol, Helional und Bourgeonal ergibt keinen Unterschied zwischen den beiden getesteten Gruppen.
- 3) Ein Zusammenhang zwischen einer fehlerhaften Rezeptorfunktion im Sinne einer verminderten olfaktorischen Sensibilität für die Duftsubstanz Bourgeonal und einer Infertilität konnte nicht nachgewiesen werden. Eine spezifische Anosmie für Bourgeonal liegt bei der Gruppe der Infertilen nicht vor.
- 4) Bourgeonal wird von infertilen Patienten subjektiv als weniger intensiv wahrgenommen als von Teilnehmern der fertilen Kontrollgruppe. Diese verminderte Intensitätseinschätzung ist spezifisch für Bourgeonal, da weder Phenylethylalkohol noch Helional als weniger intensiv eingeschätzt werden und auch in den anderen Riechtestungen keine verminderte Geruchswahrnehmung auffällig war.
- 5) Gesunde Probanden empfinden Bourgeonal als den intensivsten der drei getesteten Duftstoffe.
- 6) Eine verminderte olfaktorische Wahrnehmung des Duftstoffes Bourgeonal, konnte in der vorliegenden Studie mit keinem spezifischen Polymorphismus und/ oder bestimmten Mutation im OR1D2-Gen in Zusammenhang gebracht werden.

Literaturverzeichnis

Anonymus 1993: Richtlinien der Kassenärztlichen Bundesvereinigung für Verfahren zur Qualitätssicherung (Qualitätssicherungs-Richtlinien der KBV) gemäß § 135 Abs. 3 SGB V. Dtsch Ärztebl, 90: B 1148-1151.

Ayabe-Kanamura S, Schicker I, Laska M, Hudson R, Distel H, Kobayakawa T, Saito S 1998: Differences in perception of everyday odors: a Japanese-German cross-cultural study. Chem Senses, 23: 31-8.

Bartoshuk LM, Beauchamp JA 1994: Chemical senses. Annu Rev Psychol., 45: 419-49.

Beauchamp GK, Mennella JA 2011: Flavor perception in human infants: development and functional significance. Digestion, 83: Suppl 1: 1-6 .

Benninghoff A und D.Drenckhahn (Hrsg.) 2008: Anatomie, Urban & Fischer in Elsevier, 17. Auflage, 806-807.

Biacabe B, Norès JM, Bonfils P 2000: Description and analysis of olfactory disorders after head trauma. Review of the literature. Rev Neurol, 156:451-7.

Böhmer M, Van Q, Weyand I, Hagen V, Beyermann M, Matsumoto M, Hoshi M, Hildebrand E; Kaupp UB 2005: Ca²⁺ spikes in flagellum control chemotactic behavior of sperm. EMBO J, 24:2741-2752.

Brand G, Millot JL 2001: Sex difference in human olfaction: between evidence and enigma. Q J Exp Psychol., 54: 259-270.

Branscomb A, Seger J, White RL 2002: Evolution of odorant receptors expressed in mammalian testes. Genetics, 156(29): 785-97.

Brämerson A, Johansson L, Ek L, Nordin S, Bende M 2004: Prevalence of olfactory dysfunction: the skövde population-based study. Laryngoscope, 114:733-7.

Brenker C, Goodwin N, Weyand I, Kashikar ND, Naruse M, Krähling M, Müller A, Kaupp UB, Strünker T 2012: The CatSper channel: a polymodal chemosensor in human sperm.

EMBO J., 31: 1654-1665.

Brokaw CJ 1958: Chemotaxis of bracken spermatozoide. The role of bimalate ions. *Journal of Experimental Zoology*, 35: 192-96.

Buck L, Axel R 1991: A novel multigene family may encode odorant receptors : a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65: 175-187.

Cain WS 1989: Testing olfaction in a clinical setting. *Ear Nose Throat*, 68(4): 316, 322-8.

Cain WS, Gent JF, Goodspeed RB, Leonard G 1988: Evaluation of olfactory dysfunction in the Connecticut Chemosensory Clinical Research Center. *Laryngoscope*, 98(1): 83-8.

Case AM 2003: Infertility evaluation and management. Strategies for family physicians. *Can Fam Physician*, 49: 1465-72.

Cohen-Dayag A, Tur-Kaspa I, Dor J, Mashiach S, Eisenbach M 1995: Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors. *Prco Natl Acad Sci USA*, 92 (24): 11039-43.

Constanzo RM, Miwa T 2006: Posttraumatic olfactory loss. *Adv Otorhinolaryngol*, 63: 99-107.

Cornsweet TN 1962: The staircrase-method in psychophysics. *Am J Psychol.*, 75: 485-91.

Damm M, Eckel HE, Jungehülsing M, Hummel T 2003: Olfactory changes at treshold and supratrshold levels following septoplasty with partial inferior turbinectomy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 112: 91-7.

Dodé C, Hardelin JP 2004: Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency? *J Mol Med*, 82: 725-34.

Doty RL 1991: Olfactory system. In *Smell and Taste in Health and Disease*. T.V.Getchell, R.L. Doty, L.M. Bartoshuk, and J.B. Snow (Hrsg.), New York, Raven Press, 1803.

Doty RL, Cameron EL 2009: Sex differences and reproductive hormone influences on human odor perception. *Physiol Beh.* 97: 213-228.

Doty RL, Kamath V 2014: The influences of age on olfaction: a review. *Front Psychol*, 7:5:20. eCollection 2014.

Doty RL, McKeown DA, Lee WW, Shaman P 1995: A study of the test-retest reliability of ten olfactory tests. *Chem Senses*, 20(6): 645-56.

Doty RL, Shaman P, Kimmelman CP, Dann MS 1984: University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope*, 94(2Pt 1): 176-8.

Dreyer WJ 1998: The area code hypothesis revisited: olfactory receptors and other related transmembrane receptors may function as the last digits in a cell surface code for assembling embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 16: 9072-7.

Duchamp-Viret P, Chaput MA, Duchamp A 1999: Odor response properties of rat olfactory receptor neurons. *Science*, 284(5423): 2171-74.

Duffy VB, Davidson AC, Kidd JR, Kidd KK, Speed WC, Pakstis AJ, Reed DR, Snyder DJ, Bartoshuk LM 2004: Bitter receptor gene (TAS2R38), 6-propylthiouracil (PROP), bitterness and alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res.*, 28: 1629-37.

Eccles R 2011: Mechanisms of the symptoms of rhinosinusitis. *Rhinology*, 49(2): 131-8.

Ehrenstein W, Ehrenstein A 1999: Psychophysical methods. In Windhorst U, Johansson H (Hrsg.) *Modern techniques in neuroscience research*. Berlin, Springer, 1211-1241.

Eisenbach M 1999: Sperm chemotaxis. *Rev Reprod*, 4: 56-66.

Eisenbach M 2004: Towards understanding the molecular mechanism of sperm chemotaxis. *J Gen Physiol*, 124(2): 105-108.

Eisenbach M, Giojalas LC 2006: Sperm guidance in mammals: an unpaved road to the egg. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 7: 2276-285.

Feingold EA, Penny LA; Nienhuis AW, Forget BG 1999: An olfactory receptor gene is located in the extended human beta-globin gene cluster and is expressed in erythroid cells. *Genomics.*, 61(1): 15-23.

Feldmesser E, Olender T, Khen M, Yanai I, Ophir R, Lancet D 2006: Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. *BMC Genomics*. 7:121.

Förster G, Damm M, Gudziol H, Hummel T, Hüttenbrink KB, Just T, Muttray A, Seeber H, Temmel A, Welge-Lüssen A 2004: Olfactory dysfunction. Epidemiology pathophysiological classification, diagnosis and therapy. *HNO*, 52: 679-84.

Fukuda N, yomogida K, Okabe M, Touhara K 2004: Functional characterization of a mouse testicular olfactory receptor and its role in chemosensing and in regulation of sperm motility. *J Cell Sci*, 117 (pt24): 5835-45.

Gilad Y, Bustamante CD, Lancet D, Pääbo S 2003: Natural selection in the olfactory receptor gene family in humans and chimpanzees. *Am J Hum Genet.*, 73: 489-501.

Gilad Y, Man O, Pääbo S, Lancet D 2003: Human specific loss of olfactory receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 3324-27.

Giojalas LC, Rovasio RA, Fabro G, Gakamsky A, Eisenbach M 2004: Timing of sperm capacitation appears to be programmed according to egg availability in the female genital tract. *Fertil Steril*, 82(1): 247-9.

Glusman G, Yanai I, Rubin I, Lancet D 2001: The complete human olfactory subgenome. *Genome Res.*, 11: 685-702.

Gnoth C, Godehardt D, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Freundl G 2003: Time to pregnancy: results of the German prospective study and impact on the management of infertility. *Hum Reprod.*; 18 (9): 1959-66.

Gnoth C, Godehardt E, Frank-Herrmann P, Friol K, Tigges J, Freundl G 2005: Definition and prevalence of subfertility and infertility. *Hum Reprod.*;20 (5): 1144-7.

Gudziol H, Förster G 2002: Medicolegal screening of olfactory function. *Laryngorhinootologie*, 81(8): 586-90.

Guerrero A, Nishigaki T, Carneiro J, Tatsu Y, Wood CD, Darszon A 2010: Tuning sperm chemotaxis by calcium burst timing. *Dev Biol*, 344: 52-65.

Gurunath S, Pandian Z, Anderson RA, Bhattacharya S 2011: Defining infertility- a systematic review of prevalence studies. *Human Reprod Update*, 17 (5): 575-88.

Guss J, Doghramji L, Reger C, Chiu AG 2009: Olfactory dysfunction in allergic rhinitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 71(5): 268-72.

Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A 2012: Unexplained male infertility: diagnosis and management. *Int. Braz J Urol.*, 38 (5): 576-94.

Hasin-Brumshtein Y, Lancet D, Olender T 2009: Human olfaction: from genomic variation to phenotypic diversity. *Trends Genet*, 25(4): 178-84.

Hatt H 2004: Ein "niederer" Sinn erlangt hohe Bedeutung. *Dtsch Med Wochenschr*, 124: 2458-60.

Hatt H 2010: Geruch und Geschmack. In: Schmidt R, Thews G, Lang F (Hrsg.) *Physiologie des Menschen*. 31. Auflage, Springer, Heidelberg, 386-400.

Herting B, Bietenbeck S, Scholz K, Hähner A, Hummel T, Reichmann H 2008: Olfactory dysfunction in Parkinson's disease: ist role as a new cardinal sign in early and differential diagnosis. *Nervenarzt*, 79: 175-84.

Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, Frazer KA, Cox DR 2005: Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science.*, 307 (5712): 1072-9.

Hummel T, Gollisch R, Wildt G, Kobal G 1991: Changes in olfactory perception during the menstrual cycle. *Experientia*, 47: 712-5.

Hummel T, Konnerth CG, Rosenheim K, Kobal G 2001: Screening of olfactory function with a four-minute odor identification test: reliability, normative data, and investigations in patients with olfactory loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, 110: 976-81.

Hummel T, Nordin S 2005: Olfactory disorders and their consequences for quality of life. *Acta Otolaryngol.*, 125: 116-21.

Hummel T, Sekinger B, Wolf SR, Pauli E, Kobal G 1997: 'Sniffin' sticks': olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem Senses.*, 22(1): 39-52.

Isaksson R, Tiitinen A 2004: Present concept of unexplained infertility. *Gynecol Endocrinol.*, 18(5): 278-90.

Isobe T, Minoura H, Tanaka K, Shibahara T, Hayashi N, Toyoda N 2002: The effect of RANTES on human sperm chemotaxis. *Hum Reprod*, 17: 1441–1446.

Keller A, Zhuang H, Chi Q, Vosshall LB, Matsunami H 2007: Genetic variation in a human odorant receptor alters odour perception. *Nature*, 449 (7161): 468-72.

Klinke R, Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.) 2009: Geschmack und Geruch. *Physiologie*, Thieme Verlag: 742-55.

Ko EY, Siddigi K, Brannigan RE, Sabanegh ES Jr 2012: Empirical medical therapy for idiopathic male infertility: a survey of the American Urological Association. *J Urol.*, 187 (3): 973-8.

Kobal G, Hummel T, Sekinger B, Barz S, Roscher S, Wolf S 1996: "Sniffin' sticks": screening of olfactory performance. *Rhinology.*, 34: 222-6.

Kohler CG, Moberg PJ, Gur RE, O'Connor MJ, Sperling MR; Doty RL 2001: Olfactory dysfunction in schizophrenia and temporal lobe epilepsy. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol*, 14: 83-8.

Kondo H, Matsuda T, Hashiba M, Baba S 1998: A study of the relationship between the T&T olfactometer and the University of Pennsylvania Smell Identification Test in a Japanese population. *AM J Rhinol*, 12(5): 353.

Kremer B, Klimek L, Mösges R 1998: Clinical validation of a new olfactory test. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 255(7): 355-8.

Kuhn F, Natsch A 2009: Body odour of monozygotic human twins: a common pattern of odorant carboxylic acids released by a bacterial aminoacylase from axilla secretions contributing to an inherited body odour type. *J R Soc Interface*, 6: 377-92.

Landis BN, Konnerth CG, Hummel T 2004: A study on the frequency of olfactory dysfunction. *Laryngoscope*, 114: 1764-9.

Larsen U 2005: Research on infertility: which definition should we use? *Fertil Steril*, 83(4): 846-52.

Lindemann B 2001: Receptors and transduction in taste. *Nature*, 6413: 219-25.

Ljunggren HG, Kärre K 1990: In search of the ,missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11: 237-44.

Lötsch J, Lange C, Hummel T 2004: A simple and reliable method of clinical assessment of odor threshold. *Chem Senses*, 29(4): 311-7.

Luconi M, Baldi E 2003: How do sperm swim? Molecular mechanism underlying sperm motility. *Cell Mol Biol*, 49: 357-69.

Mascarenhas MN, Cheung H, Mathers CD, Stevens GA 2012: Measuring infertility in populations: constructing a standard definition for use with demographic and reproductive health surveys. *Popul Health Metr.*, 31;10(1): 17.

Mascarenhas MN, Flaxmann SR, Boerma T, Vanderpeol S, Stevens GA 2012: National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. *PLoS Med*: e1001356.

Menashe I, Abaffy T, Hasin Y, Goshen S, Yahalom V, Luetje CW, Lancet D 2007: Genetic elucidation of human hyperosmia to isovaleric acid. *PLoS Biol*:5 (11): e284.

Menashe I, Lancet D 2006: Variations in the human olfactory receptor pathway. *Cell Mol Life Sci.*, 63(13): 1485-93.

Meredith M 2001: Human vomeronasal organ function : a critical review of best and worst cases. *Chem Senses* 26: 433-45.

Mizuno K, Mizuno N, Shinohara T, Noda M 2004: Mother-infant skin-to-skin contact after delivery results in early recognition of own mother's milk odour. *Acta Paediatr.*, 12: 1640-5.

Mombaerts P 2004: Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci* 5: 263-78.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H 1986: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro. The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 51: 263-73.

Naudin M, Mondon K, Atanasova B 2013: Alzheimer's disease and olfaction. *Geriatr Psychol Neuropsychiatr Vieil*, 11: 287-293.

Neugebauer DC, Neuwinger J, Jockenhövel F, Nieschlag E 1990: '9+0' axonema in spermatozoa and some nasal cilia of a patient with totally immotile spermatozoa associated with thickened sheath and short midpiece. *Hum Reprod* 8: 981-6.

Nozawa M, Kawahara Y, Nei M 2007: Genomic drift and copy number variation of sensory receptor genes in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(51): 20421-20426.

Oberg C, Larsson M, Bäckman L 2002: Differential sex effects in olfactory functioning: the role of verbal processing. *J Int Neuropsychol Soc.* 8 (5): 691-8.

Olender T, Feldmesser E, Atarot T, Eisenstein M, Lancet D 2004: The olfactory receptor universe--from whole genome analysis to structure and evolution. *Genet Mol Res*, 3: 545-53.

Olsson P, Laska M 2010: Human male superiority in olfactory sensitivity to the sperm attractant odorant bourgeonal. *Chem Senses*, 35: 427-432.

Otaki JM, Yamamoto H, Firestein S 2004: Odorant receptor expression in the mouse cerebral cortex. *J Neurobiol.*, 58 (3): 315-27.

Ottaviano G, Zuccarello D, Menegazzo M, Perilli L, Marioni G, Frigo AC, Staffieri A, Foresta C 2013: Human olfactory sensitivity for bourgeonal and male infertility: a preliminary investigation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 270 (17): 3079-86.

Parmentier M, Libert F, Schurmans S, Schiffmann S, Lefort A, Eggerickx D, Ledent C, Mollereau C, Gerard C, Perret J et al. 1992: Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. *Nature*, 355: 453-5.

Porter RH, Winberg J 1999: Unique salience of maternal breast odors for newborn infants.

Neurosci Biobehav Rev., 23: 439-49.

Preti G, Wysocki CJ, Bamhart KT, Sondheimer SJ, Leyden JJ 2003: Male axillary extracts contain pheromones that affect pulsatile secretion of luteinizing hormone and mood in women recipients. Biol. Repro., 68 (6): 2107-13.

Rifell JA, Krug PJ, Zimmer RK 2002: Fertilization in the sea: the chemical identity of an abalone sperm attractant. J Exp Biol, 205: 1439-1450.

Rifell JA, Krug PJ, Zimmer RK 2004: The ecological and evolutionary consequences of sperm chemoattraction. Proc Natl Acad Sci USA, 101: 4501-6.

Rupp CI, Fleischhacker WW, Hausmann A, Mair D, Hinterhuber H, Kurz M 2004: Olfactory functioning in patients with alcohol dependence: impairments in odor judgements. Alcohol Alcohol., 39: 514-9.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR 1977: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology, 24: 104-8.

Schaal B, Marlier L, Soussignan R 2000: Human fetuses learn odours from their pregnant mother's diet. Chem Senses, 25: 729-37.

Simmen D, Briner HR; Hess K 1999: Screening of olfaction with smell diskettes. Laryngo-rhinootologie, 78 (3): 125-30.

Slama R, Hansen OK, Ducot B, Bohet A, Sorensen D, Giorgis Allemand L, Eijkemans MJ, Rosetta L, Thalabard JC, Keiding N, Bouyer J 2012: Estimation of the frequency of involuntary infertility on a nation-wide basis. Hum Reprod., 27 (5): 1489-98.

Sliwa L 1995: Chemotaction of mouse spermatozoa induced by certain hormones. Archives of Andrology, 35: 105–110.

Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Rifell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H 2003: Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science, 299: 2054-8.

Spehr M, Hatt H 2004: hOR17-4 as a potential therapeutic target. Drug News Perspect., 17 (3): 165-71.

Spehr, M., Hatt, H 2005: A potential role of odorant receptor agonists and antagonists in the treatment of infertility and contraception. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 6: 364–368.

Spehr M, Schwane K, Riffell JA, Zimmer RK, Hatt H 2006: Odorant receptors and olfactory-like signaling mechanism in mammalian sperm. *Mol Cell Endocrinol*, 16: 128-136.

Spehr M, Wetzel CH, Hatt H, Ache BW 2002: 3-phosphoinositides modulate cyclic nucleotide signaling in olfactory receptor neurons. *Neuron*, 33 (5): 731-9.

Stahl PJ, Stember DS; Goldstein M 2012: Contemporary management of male infertility. *Annu Rev Med.*, 63: 525-40.

Strünker T, Goddwin N, Brenker C, Kashikar ND, Weyand I, Seifert R, Kaupp UB 2011: The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca²⁺ influx in human sperm. *Nature*, 471: 382-386.

Suarez SS 2002: Gamete transport. In Hardy DM, editor. *Fertilization*, San Diego, Academic Press: 3-28.

Svacina S 2007: Olfaction and gestation in diabetes. *Vnitr Lek*, 53: 483-5.

Temmel AF, Pabinger S, Quint C, Munda P, Ferenci P, Hummel T 2005: Dysfunction of the liver affects the sense of smell. *Wien Klin Wochenschr.*, 117: 26-30.

Teves ME, Guidobaldi HA, Unates DR, Sanchez R, MiskaW, Publicover SJ, Morales Garcia AA, Giojalas LC 2009: Molecular mechanism for human sperm chemotaxis mediated by progesterone. *PLoS One*, 4: e8211.

Vacquier VD 1998: Evolution of gamete recognition proteins. *Science*, 281: 1995-8.

Vanderhaeghen P, Shurmanns S, Vassart G, Parmentier M 1993 : Olfactory receptors are displayed on dog mature sperm cells. *J Cell Biol.*, 123: 1441-52.

Varendi H, Porter RH 2001: Breast odour as the only maternal stimulus elicits crawling towards the odour source. *Acta Paediatr*, 90: 372-5.

Vennemann MM, Hummel T, Berger K 2008: The association between smoking and smell and taste impairment in the general population. *J Neurol.*, 255: 1121-6.

Vosshall LB 2004: Olfaction: attracting both sperm and the nose. *Curr Biol.*, 14: 918-20.

Walensky LD, Roskams AJ, Lefkowitz RJ, Snyder SH, Ronnett GV 1995: Odorant receptors and desensitization proteins colocalize mammalian sperm. *Mol. Med.*, 1: 130-141.

Weber M, Pehl U, Breer H, Strotmann J 2002: Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *J Neurosci Res.*, 68(2): 176-84.

Wedekind C, Penn D 2000: MHC genes, body odours, and odour preferences. *Nephrol Dial Transplant*, 15: 1269-71.

Weyand I, Godde M, Frings S, Weiner J, Muller F, Altenhofen W, Hatt H, Kaupp UB 1994: Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature*, 368: 859-63.

Whitman-Elia GF, Baxley EG 2001: A primary care approach to the infertile couple. *J Am Board Fam Pract.*, 14 (1): 33-45.

Wilkes S, Chinn DJ, Murdoch A, Rubin G: Epidemiology and management of infertility: a population-based study in UK primary care. *Fam Pract.*, 26 (4): 269-74.

Williams M, Hill CJ, Scudamore I, Dunphy B, Cooke ID, Barratt CL 1993: Sperm numbers and distributions within the human fallopian tube around ovulation. *Hum Reprod.*, 8 (12): 2019-26.

Witt M, Hummel T 2006: Vomeronasal versus olfactory epithelium : is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *Int Rev Cytol.*, 248: 209-59.

Wolff H, Schill WB 1996: Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Andrologie zur Qualitätssicherung in der Andrologie. *Fertilität*, 12: 130-133.

World Medical Association General Assembly 2004: Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *J Int Bioethique.*, 15: 124-9.

Yanagimachi R, Cherr GN, Pillai MC and Baldwin JD 1992: Factors controlling sperm entry into the micropyles of salmonid and herring eggs. *Development Growth and Differentiation*, 34: 447-46.

Yanagimachi R 2011: Mammalian sperm acrosome reaction: where does it begin before fertilization? *Biol Reprod.*, 85 (1): 4-5.

Yee KK, Pribitkin EA, Cowart BJ, Vainius AA, Klock CT, Rosen D, Feng P, McLean J, Hahn CG, Rawson NE 2010: Neuropathology of the olfactory mucosa in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy*, 24(2): 110-20.

Yoshida M, Inaba K, Morisawa M 1993: Sperm chemotaxis during the process of fertilization in the ascidians *Ciona savignyi* and *Ciona intestinalis*. *Dev Biol.*, 157 (2): 497-506.

Yoshida M, Yoshida K 2011: Sperm chemotaxis and regulation of flagellar movement by Ca^{2+} . *Mol Hum Reprod*, 17 (8): 457-65.

Young JM, Endicott RM, Parghi SS, Walker M, Kidd JM, Trask BJ 2008: Extensive copy-number variation of the human olfactory receptor gene family. *Am J Hum Genet.*, 83: 228-242.

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S, International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, World Health Organisation 2009: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revises glossary of ART terminology. *Fertil Steril.*, 92 (5): 1520-4.

Zhang X, Rogers M, Tian H, Zhang X, Zou DJ, Ma M, Shepherd GM, Firestein SJ 2004: High-throughput microarray detection of olfactory receptor gene expression in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101 (39): 14168-73.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Cyclamal als Template für das rezeptives Feld von hOR 17-4, aktive und inaktive Liganden (aus Spehr et al. 2003).....	7
Abbildung 2: Aktive Liganden von hOR 17-4 (aus: Spehr et al. 2003).....	7
Abbildung 3: Henkel Mix 10/2 mit Undecanal und Bourgeonal (aus Spehr et al. 2003).....	8
Abbildung 4: Schematische Anatomie des reifen Spermatozoen (aus Benninghoff 1993)....	8
Abbildung 5: Schwimmverhalten menschlicher Spermien in vitro nach Applikation von Bourgeonal und Kontrolle (Tubarflüssigkeit) (aus Spehr et al. 2003).....	10
Abbildung 7: Verteilung der Ursachen ungewollter Kinderlosigkeit zwischen Mann und Frau, WHO 1987.....	18
Abbildung 8: Sniffin' Sticks Screening 12 Test (Firma Burghart Messtechnik).....	24
Abbildung 9: Durchführung der Sniffin' Sticks Untersuchung (Riech-und Schmecklabor, Uniklinikum Dresden, Bild von Dr. Bae-Gartz).....	25
Abbildung 10: Sniffin' Sticks Screening Test.....	37
Abbildung 11: Schwellentestung Phenylethylalkohol.....	38
Abbildung 12: Schwellentestung Bourgeonal.....	39
Abbildung 13: Schwellentestung Helional.....	39
Abbildung 15: Intensitätseinschätzung Phenylethylalkohol.....	40
Abbildung 16: Intensitätseinschätzung Bourgeonal.....	41
Abbildung 17: Intensitätseinschätzung Helional.....	41
Abbildung 19: Zusammenfassung Schwellentestung.....	43
Abbildung 20: Zusammenfassung Intensitätseinschätzung.....	44
Abbildung 21: Lage der SNPs im Leserahmen des OR1D2-Gens.....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufbau des Screeningtests. Targets sind fett gedruckt, Distraktoren normal.	26
Tabelle 2: Dokumentation Schwellen/Diskriminationstestung. Die ermittelte Schwelle liegt in diesem Beispiel bei 5,0.....	29
Tabelle 3: PCR Ansatz.....	34
Tabelle 4: Einzelnukleotidpolymorphismen der durchgeführten Genotypisierung	42