

**ELS PREMIS NOBEL
DE L'ANY 2004**

**SOBRE EL
PREMI NOBEL DE MEDICINA
CONCEDIT A**

**RICHARD AXEL I
LINDA B. BUCK,**

A CÀRREC

**D'ENRIQUE CLARO IZAGUIRRE,
DE LA UNIVERSITAT
AUTÒNOMA DE BARCELONA**

MECANISMES MOLECULARS DE LA RECEPCIÓ I LA PERCEPCIÓ OLFACTÒRIA

INTRODUCCIÓ

El sentit de l'olfacte té un protagonisme fonamental en la supervivència i adaptació en el món animal. Permet el registre continu de l'entorn químic de l'organisme en forma de petites molècules volàtils, procedents de fonts d'alimentació, parelles reproductores, simbiòtiques o hospedadores, preses i depredadors. Per a tal fi, el sistema olfatori constitueix un quimiodetector d'extraordinària sensibilitat i resolució, capaç de reconèixer compostos presents en concentracions de l'ordre picomolar (10^{-12} M) i de discriminar entre milers d'olors diferents.

92

La percepció d'una olor es duu a terme mitjançant dos processos principals: la recepció de l'estímul odorífer en el neuroepiteli nasal —en mamífers— i el processament d'aquesta informació en el bulb olfatori i altres centres cerebrals. La primera etapa de la recepció de l'estímul es dona quan les molècules odoríferes són inhalades i es dissolen en la mucositat que cobreix l'epiteli olfatori, i després interactua amb milions de neurones sensorials. Aquestes neurones bipolars envien un axó no mielinitzat cap al bulb olfatori principal (MOB) i una única dendrita cap a la llum de l'epiteli, on es divideix en entre cinc i vint cilis que es projecten en direcció a la capa mucosa. En aquests cilis, exposats al medi extern, és on hi ha la primera etapa de transducció del senyal olfatori, un seguit de reaccions que finalment donen pas a un augment en la conductància de la membrana per a cations. Aquest augment de conductància origina una despolarització local que podrà donar lloc a un canvi en la freqüència de generació de potencials d'acció, si supera un cert potencial límit en l'inici de l'axó. D'aquesta manera, un de-

terminat estímul olfatori origina un patró concret d'activitat elèctrica de la cèl·lula receptora, el qual, un cop descodificat pel cervell, provocarà la percepció d'una olor característica. Richard Axel i Linda B. Buck, guanyadors del Premi de la Fundació Nobel 2004 en Medicina o Fisiologia, han realitzat importants contribucions al coneixement de la naturalesa dels receptors sensorials de l'olfacte.

ESTRUCTURA ANATÒMICA I CEL·LULAR DEL SISTEMA OLFATORI

El neuroepiteli olfatori, de 100-200 μm de gruix en vertebrats i una àrea variable, que va des d'uns pocs centímetres quadrats en els humans i amfibis fins a més de 100 cm^2 en el gos,¹ se situa en la zona posterior de la cavitat nasal. És del tipus pseudoestratificat (fig. 1) i està format per tres tipus

93

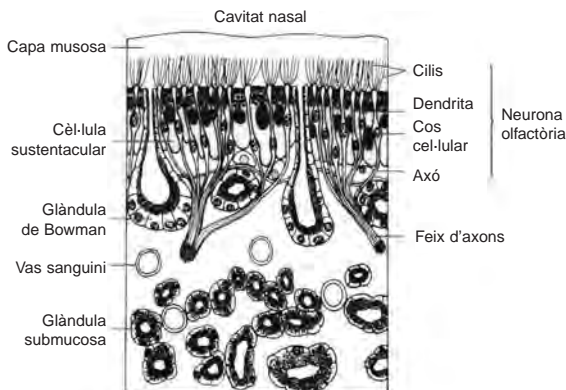


FIGURA 1. Estructura histològica de l'epiteli olfatori.

1. D. G. MOULTON i L. M. BEIDLER (1967), «Structure and function in the peripheral olfactory system», *Physiol. Rev.*, núm. 47, p. 1-52.

cel·lulars principals,² els nuclis dels quals formen capes ben definides.

La capa més superficial de nuclis correspon a cèl·lules de sustentació, de naturalesa glial, amb funció secretora en direcció a la capa de moc superficial. La capa central de nuclis és de les neurones sensorials, cèl·lules bipolars amb una dendrita sense ramificar que termina en la superfície formant una petita inflorescència d'on parteixen entre cinc i vint cilis mancats de motilitat, d'entre 30 i 200 µm de longitud. Els axons, no mielinitzats i sense ramificar, es reuneixen en feixos a la base de l'epiteli, on s'envolten de cèl·lules de Schwann, i formen el nervi olfatori (primer parell cranial) fins al bulb olfatori principal. La capa més profunda de nuclis a l'epiteli olfatori correspon a les anomenades *cèl·lules basals*, indiferenciades i capaces de dividir-se i evolucionar fins a neurones sensorials. Així, el neuroepiteli olfatori constitueix un cas excepcional de població neuronal, ja que experimenta una contínua renovació en vertebrats adults. A més d'aquestes cèl·lules, el neuroepiteli olfatori conté cèl·lules secretores epitelials, agrupades en les anomenades *glàndules de Bowman*, que contribueixen amb les cèl·lules sustentaculars en la secreció de la capa mucosa superficial. Ambdós tipus de cèl·lules secretores estan sota control β-adrenèrgic i colinèrgic.

Els feixos d'axons primaris de les neurones sensorials, després de travessar la placa cribosa de l'os esfenoidal, entren al bulb olfatori principal, on té lloc el primer relleu sinàptic. El bulb olfatori és una zona anatòmica parella, amb una estructura clarament estratificada i que conté dos tipus principals de neurones, les cèl·lules mitrals, superficials (pròximes a la capa glial), i les cèl·lules granulars, més profundes

2. B. P. M. MENDO (1983), *The Structure of Olfactory and Nasal Respiratory Epithelial Surfaces*. Florida, CRC Press, Boca Raton.

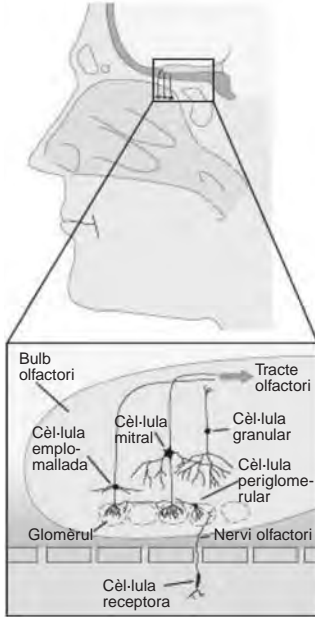


FIGURA 2. Connexions neuronals en el bulb olfatori.

tipus cel·lulars del bulb, mitjançant evaginacions de les dendrites denominades *gèmules*. A més d'aquests dos tipus principals, existeixen alguns tipus d'interneurones, entre les quals destaquen les cèl·lules periglomerulars i les cèl·lules emplomallades, que també reben aferències dels axons de l'epiteli olfatori als glomèruls.

3. S. RAMÓN Y CAJAL (1911), *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*, vol. II, París, A. Maloine.

4. E. ORONA, J. W. SCOTT i E. C. RAINER (1983), «Different granule cell populations innervate superficial and deep regions of the external plexiform layer in rat olfactory bulb», *J. Comp. Neurol.*, núm. 217, p. 227-237.

(pròximes al ventricle). Sobre les cèl·lules mitrals,³ les neurones més grans del bulb estableixen sinapsis amb els axons de l'epiteli olfatori, en unes denses arboritzacions dendrítiques anomenades *glomèruls*. Les cèl·lules mitrals emeten axons secundaris cap a la zona interna del bulb, on s'agrupen en els tractes olfatoris i innerven altres zones cerebrals, fins i tot l'escorça olfatori i àrees del sistema límbic. Les cèl·lules granulars,⁴ també característiques del bulb olfatori, són neurones sense axó que realitzen contactes dendrodendrítics inhibitoris sobre la resta de

En la recerca per a identificar els receptors primaris de molècules odoríferes, es van barrejar diverses hipòtesis, entre les quals es pot esmentar la interacció directa d'aquestes molècules amb la membrana, alterant les seves propietats fisicoquímiques⁵ o la interacció amb proteïnes de la capa mucosa de l'epiteli olfatori.⁶ La primera possibilitat tenia el problema de la patent manca d'especificitat; la segona, la poca diversitat de proteïnes fixadores de molècules odoríferes (*odorant binding proteins*, OBP) en la mucosa. Aquestes proteïnes, que fixen odorífers amb alta afinitat, semblen tenir més a veure amb funcions de transport d'odorífers, que acostumen a ésser molècules relativament lipofíliques, a través del mitjà hidròfil de la mucosa, ja sigui abans de l'excitació, o després, per a facilitar la seva inactivació.⁷ En general, els criteris que havien de complir aquests receptors, i que es van aprofitar per a identificar-los, eren els següents:⁸

- especificitat tissular: han d'expressar-se científicament en l'epiteli olfatori,
- enriquiment en els cilis, ja que és on resideix la maquinària enzimàtica de transducció de l'estímul,
- ésser proteïnes integrals de membrana, amb domi-

5. T. NOMURA i K. KURIHARA (1987), «Liposomes as a model for olfactory cells: changes in membrane potential in response to various odorants», *Biochemistry*, núm. 26, p. 6135-6140.

6. J. PEVSNER, P. B. SKLAR i S. H. SNYDER (1986), «Odorant-binding protein: localization to nasal glands and secretions», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 83, p. 4942-4946.

7. T. N. DEAR, T. BOEHM, E. B. KEVERNE i T. H. RABBITS (1991), «Novel genes for potential ligand-binding proteins in subregions of the olfactory mucosa», *EMBO J.*, núm. 10, p. 2813-2819.

8. D. LANCET (1986), «Vertebrate olfactory reception», *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 9, p. 329-355.

nis extracel·lulars i intracel·lulars, per a interactuar amb el lligand odorífer i amb el sistema de transducció,

— heterogeneïtat de seqüència, que pugui explicar les diferents respostes a diversos estímuls olfatoris,

— interacció amb proteïnes transductores de senyals (proteïnes G, canals, enzims...),

— reconstitució de la modulació d'activitats enzimàtiques per molècules odoríferes.

La capacitat de l'epiteli olfatori de discriminar entre milers d'estímuls depèn de l'especificitat amb què els odorífers interactuen amb els seus receptors en les neurones sensorials. Així, el fet d'entendre la naturalesa, diversitat i especificitat d'aquests receptors és clau per a comprendre la base molecular de la recepció olfactiva. En teoria, aquesta capacitat de resolució podria assolir-se amb un nombre molt limitat de receptors amb afinitats variables vers els diferents estímuls, de manera anàloga a la base molecular de la visió del color. Una altra alternativa seria l'existència d'una gran família de receptors amb especificitats molt definides per les distintes molècules odoríferes.

97

Identificació d'una nova família multigènica

L'any 1991, L. B. Buck i R. Axel⁹ van identificar una família multigènica en rata que codifica els receptors de molècules odoríferes. Per a tal fi, aquests investigadors van assumir que aquest tipus de receptors havien de pertànyer a la superfamília de receptors amb set dominis transmembranals, els quals

9. L. B. BUCK i R. AXEL (1991), «A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition», *Cell*, núm. 65, p. 175-187.

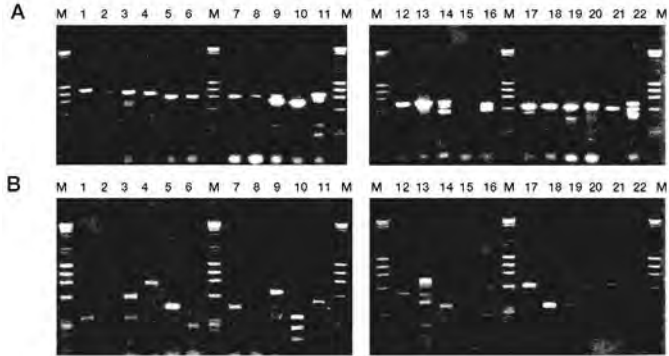


FIGURA 3. *a)* Els cDNA preparats a partir de RNA d'epiteli olfatori es van amplificar mitjançant PCR en dues etapes, usant diversos parells d'oligonucleòtids degenerats; *b)* cada un dels productes anteriors es va dirigir amb *Hinfl*. La digestió del producte PCR 13 va rendir un nombre de fragments les mides dels quals sumen un total més gran que el de PCR 13. De L. B. Buck i R. Axel (1991), *Cell*, núm. 65, p. 175-187.

98

exerceixen la seva acció sobre enzims efectors mitjançant l'activació de proteïnes G heterotrimèriques, ja que se sabia que les preparacions de cilis de neurones olfàctòries exhibien activitats adenilil ciclase o fosfolipasa C en presència d'odorífers, que eren estretament dependents de la presència de GTP o dels seus anàlegs no hidrolitzables.^{10, 11}

L'estratègia emprada per a identificar els gens d'aquests receptors va consistir a usar una variant de la reacció en cadena de la polimerasa (RT-PCR) a fi d'amplificar seqüències de RNA de l'epiteli olfatori que codifiquessin per a receptors de la superfamília de set dominis transmembra-

10. U. PACE, E. HANSKI, Y. SALOMON i D. LANCET (1985), «Odorant-sensitive adenylate cyclase may mediate olfactory reception», *Nature*, núm. 316, p. 255-258.

11. T. HUQUE i R. C. BRUCH (1986), «Odorant- and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 137, p. 36-42.

nals, per a després determinar si cap dels productes amplificats contenia espècies múltiples de DNA, la qual cosa indicaria que s'havien amplificat membres d'alguna família multigènica. Com a encebadors de la polimerasa es van fer servir dues sèries d'oligonucleòtids degenerats, corresponents a zones dels dominis transmembranals 2 i 7 de diversos receptors coneguts acoblats a proteïnes G, en totes les combinacions possibles. Després de dues etapes d'amplificació amb els mateixos encebadors, seleccionant en cada etapa per electroforesi els productes de la grandària esperable per a la família de receptors (de sis-cents a mil tres-cents parells de bases), es van obtenir un seguit de productes que apareixien com bandes senzilles després de l'electroforesi en agarosa (fig. 3a). A continuació els autors van raonar que els receptors d'odorífers haurien d'exhibir una apreciable variabilitat estructural, atesa la seva capacitat de reconèixer multitud de molècules de diverses estructures, per la qual cosa havien de formar una subfamília gènica. Per a determinar si cap dels productes de la PCR corresponia a l'amplificació d'una família multigènica, es van tractar amb endonucleases de restricció, de manera que en alguns casos van aparèixer, després de l'electroforesi, bandes la suma de les mides de les quals corresponia a una grandària clarament superior a la inicial (710 parells de bases en el cas de PCR 13, fig. 3b). Un cop clonat aquest producte de la PCR, la seva anàlisi va revelar la presència de múltiples seqüències corresponents a membres nous de la superfamília de receptors de set dominis.

Posteriorment es van aïllar, de diverses genoteques d'epiteli olfatori, cDNA homòlegs als productes PCR 13 de la figura 3. L'anàlisi de la seqüència d'una quarantena d'aquests clons va confirmar que tots codifiquen proteïnes que pertanyen a la mateixa família de receptors que les codifiquen per PCR 13. D'altra banda, utilitzant segments d'aquests clons com a sondes marcades contra RNA de diversos teixits,

es va observar que la hibridació únicament té lloc amb RNA d'epiteli olfatori. Encara més, després de construir una genoteca de cDNA a partir d'una població cel·lular enriquida en neurones receptores, es va observar una freqüència més gran de clons portadors de DNA de la família de receptors, la qual cosa suggeria que aquests s'expressen preferentment (o exclusiva) en neurones olfactòries.

Dilucidació de l'estructura primària

Els receptors de molècules odoríferes (OR) contenen tots els denominadors comuns als receptors acoblats a proteïnes G heterotrimèriques: set dominis hidrofòbics que se suposa que creuen la membrana (fig. 4),¹² un punt de N-glucosilació en la zona N-terminal, absència de pèptid senyal a l'extrem N-terminal, restes de cisteïna (Cys) en posicions concretes dels dos primers bucles extracel·lulars, que se suposa que formen un pont disulfur, llocs de fosforilació potencial al tercer bucle

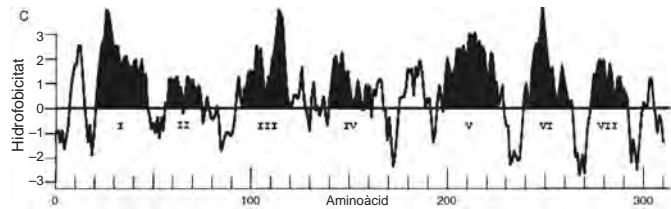


FIGURA 4. Perfil d'hidrofobicitat dels receptors de molècules odoríferes. De O. Nef *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, p. 8948-8952.

12. O. NEF, I. HERMANS-BORGMAYER, H. ARTIÈRES-PIN, L. BEASLEY, V. E. DIONNE i S. F. HEINEMANN (1992). «Spatial pattern of receptor expression in the olfactory epithelium», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, p. 8948-8952.

citoplasmàtic, que és el que interactua amb la subunitat α de les proteïnes G, i, en la major part dels casos, una resta de Cys al segment C-terminal que pot servir com a lloc d'unió d'una molècula d'àcid palmític, ancorant aquesta zona en la membrana, com és el

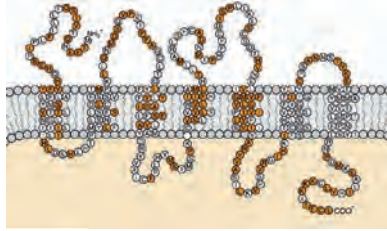


FIGURA 5. Residus variables en els receptors olfactivs (taronja). De L. Buck i R. Axel (1991), *Cell*, núm. 65, p. 175-187.

cas del receptor β_2 -adrenèrgic.¹³ Ara bé, existeixen diferències importants entre la família d'OR i altres receptors de set dominis transmembranals. Estudis de mutagènesi dirigida han demostrat que els lligands adrenèrgics interactuen amb els seus receptors a la vora del pla de la membrana,¹⁴ i, consegüentment, les subfamílies de receptors que interactuen amb el mateix tipus de lligands (per exemple, els receptors adrenèrgics) exhibeixen una gran identitat de seqüència (> 80 %) en els dominis transmembranals. Per contra, la família d'OR mostra una elevada variabilitat en els dominis transmembranals III, IV i V (fig. 5).

Aquesta variabilitat es considera que reflecteix la diversitat de llocs de fixació per a l'amplíssim espectre d'estructures moleculars que reconeixen els OR. Atenent a les seqüències variables dels OR estudiats fins al moment, direm que es poden classificar en grups més o menys relacionats, de

13. B. F. O'DOWD, R. J. LEFKOWITZ i M. G. CARON (1989), «Structure of the adrenergic and related receptors», *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 12, p.67-83.

14. C. D. STRADER, I. S. SIGAL i R. A. F. DIXON (1989), «Structural basis of beta-adrenergic receptor function», *FASEB J.*, núm. 3, p. 1825-1832.



FIGURA 6. Topologia dels receptors acoblats a proteïnes G: a) OR, b) rodopsina, c) muscarínic M3, d) metabotròpic del glutamat mGlu5.

102

membres coneguts de receptors acoblats a proteïnes G revela una certa similitud d'aquells amb els fotoreceptors com la rodopsina retiniana. Ambdós tipus de receptor sensorial tenen bucles intracitoplasmàtics i extracitoplasmàtics de mida mínima. Així, el tercer bucle intracitoplasmàtic, que se suposa que interactua amb proteïnes G, consta tan sols de 20 aminoàcids en OR i opsines, mentre que els receptors muscarínics els formen 240 residus. D'altra banda, tant els extrems N-terminal com C-terminal són molt curts (d'uns 25 aminoàcids), mentre que en altres receptors, com són ara els metabotròpics del glutamat, de la trombina o els d'algunes hormones, tots dos extrems i particularment l'extrem N-terminal són molt més llargs (fig. 6). Per la seva mínima estructura, s'ha suggerit que tant OR com opsines poden representar els membres més ancestrals de la superfamília de receptors.¹⁶

Actualment, la complexitat del repertori de receptors olfactoris s'estima en uns 1.000 gens en ratolí i rata, de 500

15. L. BUCK (1992), «The olfactory multigene family», *Curr. Opin. Genet. Dev.*, núm. 2, p. 467-473.

16. H. BREER, K. RAMING i J. KRIEGER (1994), «Signal recognition and transduction in olfactory neurons», *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1224, p. 277-287.

manera que els OR amb més identitat de seqüència probablement reconeixeran odorífers similars, mentre que OR de seqüències divergents reconeixerien odorífers d'estructures diferents.¹⁵ La comparació de les estructures primàries i la tipologia dels OR amb altres

a 750 en humans i uns 100 en peixos.¹⁷ Una interessant característica d'aquests gens és que pràcticament tots s'expressen, amb la notable excepció dels dels humans, on fins a un 75 % podrien ésser pseudogens generats pel canvi de fase, mutacions sense sentit o delecions.¹⁸ La gran degeneració dels gens humans pot tenir relació amb el nostre inferior sentit de l'olfacte en comparació amb altres espècies: possiblement va existir una menor pressió selectiva sobre aquests gens durant l'evolució de l'*Homo sapiens*, en fonamentar-se més en els sentits de la vista i l'oïda.

Altres famílies de receptors de molècules odoríferes

- Receptors vomeronasals

En els vertebrats terrestres hi ha un segon òrgan de quimio-detecció de molècules volàtils, l'òrgan vomeronasal, situat en una estructura tubular del septe nasal que es connecta amb la cavitat nasal mitjançant un conducte. Es tracta d'un altre epitelí similar a l'olfactori, les neurones receptores del qual, especialitzades en la detecció de feromones, emeten axons que innerven el bulb olfactori accessori, de localització caudal respecte del bulb olfactori principal (fig. 7). El bulb olfactori accessori es connecta exclusivament amb centres del sistema límbic implicats en conductes de reproducció i agressió,¹⁹ que no impliquen centres cognitius superiors. L'extrir-

17. P. Mombaerts (1999), «Seven transmembrane proteins as odorant and chemosensory receptors», *Science*, núm. 286, p. 707-711.

18. S. Rouquier, S. Taviaux, B. J. Trask, V. Brand-Arpon i G. van den Engh (1998), «Distribution of olfactory receptor genes in the human genome», *Nat. Genet.*, núm. 18, p. 243-250.

19. L. B. Buck (2000), «The molecular architecture of odor and pheromone sensing in mammals», *Cell*, núm. 100, p. 611-618.

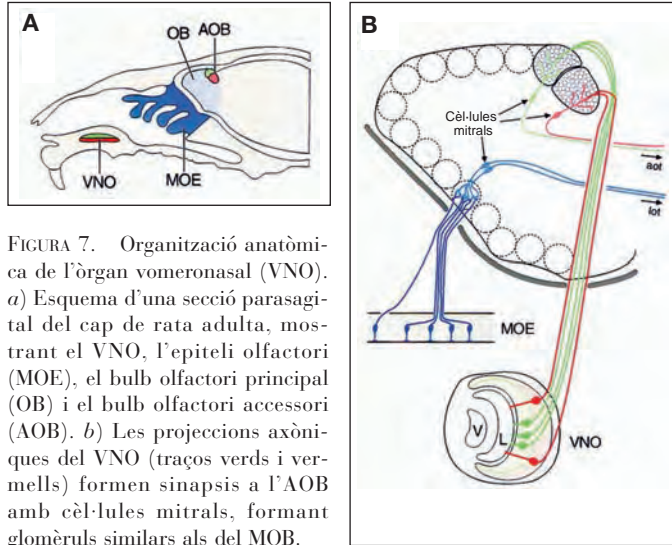


FIGURA 7. Organització anatòmica de l'òrgan vomeronasal (VNO). *a*) Esquema d'una secció parasagittal del cap de rata adulta, mostrant el VNO, l'epiteli olfatori (MOE), el bulb olfatori principal (OB) i el bulb olfatori accessori (AOB). *b*) Les projeccions axòniques del VNO (traços verds i vermells) formen sinapsis a l'AOB amb cèl·lules mitrals, formant glomèruls similars als del MOB.

104

pació quirúrgica de l'òrgan vomeronasal no té efectes sobre la detecció olfactiva, però impedeix el reconeixement de senyals químics definits amb el nom de *feromones*, la naturalesa química exacta de les quals encara no s'ha determinat en la majoria dels casos. Presents a l'orina, la suor i altres secrecions corporals, les feromones porten informació referent a l'espècie, el sexe i la identitat individual, de manera que desencadenen respostes neuroendocrines i de comportament estereotipades que assegurin la reproducció i l'ordre jeràrquic en un grup. A diferència dels mecanismes moleculars de transducció de senyals codificats pels OR (vegeu-ho més endavant), se sap ben poc de la identitat dels components implicats en la senyalització en l'òrgan vomeronasal. Les neurones d'aquest epiteli no expressen components típics de les neurones olfactives com la proteïna $G\alpha_{olf}$; en canvi, expressen unes altres dues subunitats α de les proteïnes G

heterotrimèriques, $G\alpha_{i2}$ i $G\alpha_o$, amb un clar patró de segregació espacial, de manera que $G\alpha_{i2}$ s'expressa en la superfície apical de l'epiteli i $G\alpha_o$ s'expressa a la zona ventral (fig. 8).²⁰

L'any 1995, mitjançant una estratègia d'escrutini diferencial de genotèques de cDNA preparades a partir de neurones de l'òrgan vomeronasal, el grup de Richard Axel va identificar una família de gens que codifiquen una nova família de receptors de set dominis transmembranals diferent de la dels OR quant a homologies de seqüència, però similar quant a l'estructura (V1R, fig. 9). Curiosament, es va trobar que els transcrits aïllats en virtut de la seva homologia de seqüència amb aquests receptors s'expressen únicament en una àrea concreta de l'epiteli vomeronasal, pròxim a la superfície apical,²¹ coincident amb la regió on

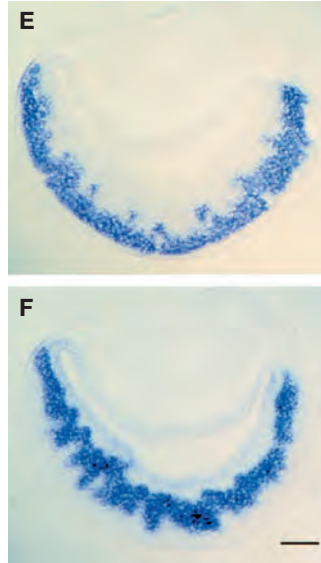


FIGURA 8. Seccions de l'òrgan vomeronasal de rata hibridades amb sondes de $G\alpha_o$ (e) i $G\alpha_{i2}$ (f) marcades amb digoxigenina. De H. Matsunami i L. B. Buck (1997), *Cell*, núm. 90, p. 775-784.

20. A. BERGHARD i L. B. BUCK (1996), «Sensory transduction in vomeronasal neurons: evidence for G alpha o, G alpha i2, and adenylyl cyclase II as major components of a pheromone signaling cascade», *J. Neurosci.*, núm. 16, p. 909-918.

21. C. DULAC i R. AXEL (1995), «A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals», *Cell*, núm. 83, p. 195-206.

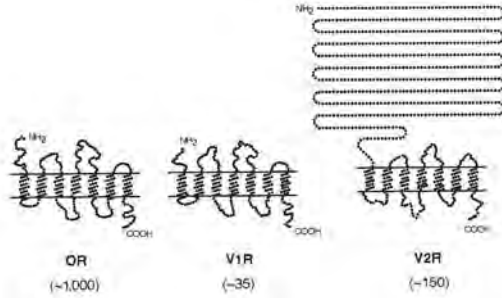


FIGURA 9. Estructures de les dues famílies de receptors vomeronasals. De L. B. Buck (2000), *Cell*, núm. 100, p. 611-618.

s'expressa $G\alpha_{i2}$. Dos anys més tard, la mateixa aproximació experimental, però emprant genoteques de neurones $G\alpha_o^+$ - $G\alpha_{i2}^-$ de la zona ventral de l'epiteli, va permetre al grup de Linda Buck, que ja s'havia establert pel seu compte, d'identificar una segona família de gens, els quals codifiquen possibles receptors de feromones.^{22, 23} Aquests receptors, a diferència dels OR i els VR1, mostren similitud de seqüència i estructura amb els receptors metabotròpics del glutamat (V2R, fig. 9). Malgrat que la distinta estructura de les dues famílies suggereix que podrien reconèixer diferents tipus d'estructures químiques, encara que no s'han identificat lligands específics per a aquests receptors.

• Receptors quimiosensorials de *Caenorhabditis elegans*

La quimiodetecció és el principal mode de relació en nematodes, organismes que no hi veuen ni hi senten. Un *C. elegans*

22. H. MATSUNAMI i L. B. BUCK (1997), «A multigene family encoding a diverse array of putative pheromone receptors in mammals», *Cell*, núm. 90, p. 775-784.

23. G. HERRADA i C. DULAC (1997), «A novel family of putative pheromone receptors in mammals with a topographically organized and sexually dimorphic distribution», *Cell*, núm. 90, p. 763-773.

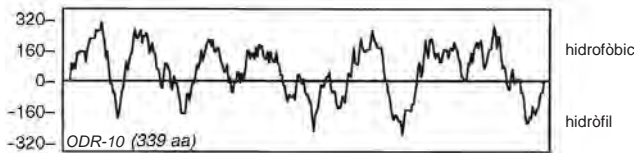


FIGURA 10. Perfil d'hidrofobicitat del receptor ODR-10 de *Caenorhabditis elegans*. De P. Sengupta *et al.* (1996), *Cell*, núm. 84, p. 875-887.

adult té tres-cents dues neurones, de les quals catorze, distribuïdes en parells bilaterals, detecten la composició química del medi. Així, la neurona ASE detecta la quimiotaxi cap a substàncies hidrosolubles, mentre que les neurones AWA i AWC detecten substàncies volàtils. Com que es tracta d'organismes tan simples, té poc significat distingir entre gust i olfacte, per la qual cosa es parla globalment de receptors quimiosensorials (CR). Els gens dels CR van ésser identificats l'any 1995 mitjançant una aproximació bioinformàtica: la inspecció del genoma de *C. elegans* va permetre d'identificar una família de més de quaranta gens molt divergents de receptors de set dominis transmembranals (fig. 10), la major part dels quals s'expressen en grups discrets de neurones quimiosensorials.²⁴ Quan la seqüenciació del genoma de *C. elegans* es va completar el 1998, dels aproximadament dinou mil gens, es va estimar que el repertori de CR podria assolir la xifra de cinc-cents receptors funcionals,²⁵ de llarg la família gènica més gran del nematode. Donada la simplicitat d'aquest organisme, se sap que el tipus de resposta davant un determinat estímul depèn tant del tipus de receptor com de la

24. E. R. TROEMEL, J. H. CHOU, N. D. DWYER, H. A. COLBERT i C. I. BARGMANN (1995), «Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*», *Cell*, núm. 83, p. 207-218.

25. C. I. BARGMANN (1998), «Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome», *Science*, núm. 282, p. 2028-2030.

neurona en què s'expressa. Així, el receptor ODR-10, que s'expressa normalment en les dues neurones AWA (fig. 11) i afavoreix la quimiotaxi positiva de l'organisme pel diacetil (2,3-butanodiona); en canvi, afavoreix la quimiotaxi negativa per aquesta mateixa molècula quan s'expressa ectòpicament en les neurones AWB, que normalment afavoreixen la conducta d'evitació de molècules com la 2-nonaona.²⁶ Curiosament, els animals transgènics que expressen ODR-10 tant en les neurones AWA com en les AWB es tornen indiferents al diacetil, a causa possiblement dels dos senyals olfactoris contradictoris. El receptor ODR-10, després d'expressar-se en cèl·lules HEK293 d'origen humà,²⁷ els confereix la capacitat de respondre a concentracions micromolars de diacetil amb elevacions transitòries en la concentració intracel·lular de calci (fig. 12) que són sensibles a cafeïna, la qual cosa suggereix que el sistema de transducció en aquest sistema el constitueix la mobilització de calci pel $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$.

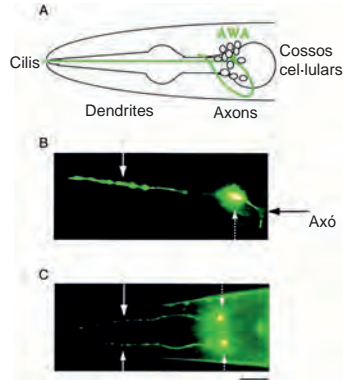


FIGURA 11. El gen de fusió *odr10::GFP* s'expressa únicament en les dues neurones AWA. B i C són vistes laterals i dorsals de l'organisme. De P. Sengupta *et al.* (1996), *Cell*, núm. 84, p. 875-887.

26. E. R. TROEMEL, B. E. KIMMEL i C. I. BARGMANN (1997), «Reprogramming chemotaxis responses: sensory neurons define olfactory preferences in *C. elegans*», *Cell*, núm. 91, p. 161-169.

27. Y. ZHANG, J. H. CHOU, J. BRADLEY, C. I. BARGMANN i K. ZINN (1997), «The *Caenorhabditis elegans* seven-transmembrane protein ODR-10 functions as an odorant receptor in mammalian cells», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 94, p. 12162-12167.

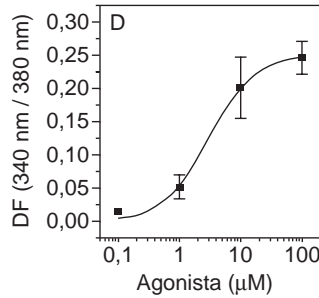
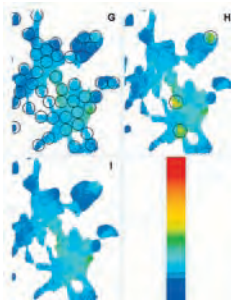


FIGURA 12. Funcionalitat del receptor ODR-10 expressat en cèl·lules humanes HEK293. Corba concentració-efecte per al senyal de fluorescència de Fura-2 induït per diacetil. L'EC₅₀ calculada a partir de l'ajustament a l'equació de Hill és de 2,25 µM. De Y. Zhang *et al.* (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 94, p. 12162-12167.

- Receptors olfactoris de *Drosophila melanogaster*

Una aproximació bioinformàtica similar a la que va permetre d'identificar els receptors quimiosensorials de *C. elegans* es va emprar l'any 1999 per a identificar receptors de molècules odoríferes en el 16 % del genoma seqüenciat de *Drosophila melanogaster* que hi havia disponible.^{28, 29} La mosca adulta té dos òrgans olfactoris: el tercer artell de l'antena i el palp maxil·lar (fig. 13), en els quals es localitzen les neurones receptores. Els axons d'aquestes neurones es projecten a un lòbul del cervell on té lloc la primera sinapsi en estructures que també s'anomenen *glomèruls*. Les seqüències identificades, a semblança de les de *C. elegans*,

109

28. P. J. CLYNE, C. G. WARR, M. R. FREEMAN, D. LESSING, J. KIM i J. R. CARLSON (1999), «A novel family of divergent seven-transmembrane proteins: candidate odorant receptors in *Drosophila*», *Neuron*, núm. 22, p. 327-338.

29. L. B. VOSSHALL, H. AMREIN, P. S. MOROZOV, A. RZHETSKY i R. AXEL (1999), «A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna», *Cell*, núm. 96, p. 725-736.



FIGURA 13. Les neurones olfactòries de *D. melanogaster* es localitzen al tercer artell de l'antena (fletxa) i al palp maxil·lar (punta de fletxa).

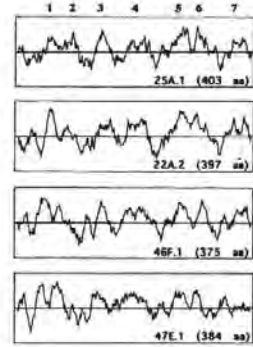


FIGURA 14. Perfil d'hidrofobicitat d'alguns receptors olfactors de *D. melanogaster*. De P. J. Clyne *et al.* (1999), *Neuron*, núm. 22, p. 327-338.

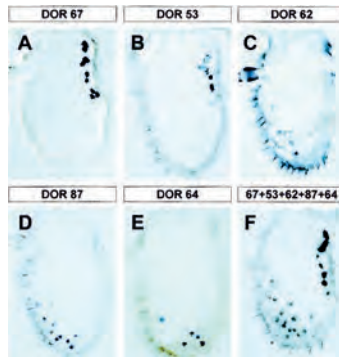


FIGURA 15. Expressió de receptors de molècules odoríferes en regions definides dels òrgans olfactors de *D. melanogaster* (DOR). Sondes de RNA anti-sentit marcades amb digoxigenina, corresponents a vuit gens diferents, hibriden en zones ben definides del tercer artell de l'antena. De L. B. Vosshall *et al.* (1999), *Cell*, núm. 96, p. 725-736.

tenen introns i un elevat grau de divergència entre elles, malgrat que codifiquen proteïnes de set dominis transmembranals (fig. 14). Amb el 16 % del genoma escrutat, s'han identificat disset d'aquests gens, que s'expressen en sub poblacions de neurones receptores ben definides topogràficament (fig. 15), per la qual cosa el conjunt de receptors

TAULA 1
Les cinc famílies conegudes de receptors d'olorífers

	OR	Receptors vomeronasals (1a família)	Receptors vomeronasals (2a família)	Receptors quimiosensorials de <i>C. elegans</i>	OR de <i>D. melanogaster</i>
Any de descobriment	1991	1995	1997	1995	1999
Mida*	1000**	100	140	800	100
Presència d'introns	No	No	Sí	Sí	Sí
Nombre de gens que s'expressen per neurona	1?	1?	1?	20	1?

* Inclouent-hi pseudogens. ** En rosegadors

olorífers en *D. melanogaster* podria tenir un centenar de membres, fet que constituiria la família gènica més gran en aquest organisme.

TRANSDUCCIÓ DE SENYALS EN ELS CILIS OLFACTORIS

Durant els darrers vint anys, abans que Axel i Buck identifiquessin els OR, s'han acumulat proves convincentes que impliquen l'activació de cascades de segons missatgers prèvies a la generació de respostes elèctriques de les neurones sensorials després d'un determinat estímul olfatori. Una de les indicacions clares de la presència de segons missatgers la constituïa el clar retard, d'entre 500 ms i 1 s, entre l'estímul olfatori i l'inici del corrent elèctric transmembranal responsable de la despolarització de la neurona (fig. 16).

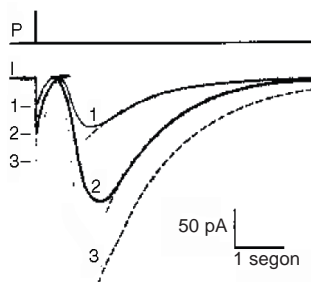


FIGURA 16. De G. Siegel *et al.* (1994), *Basic Neurochemistry*, 5a ed., Nova York, Raven Press.

La investigació del mecanisme de transducció associat a la recepció olfactiva va començar quan es va demostrar que les preparacions de cilis de neurones receptores contenen una elevada activitat adenilil ciclase, la qual resultava estimulada per certs odorífers³⁰ en presència de GTP, cosa que indicava d'altra banda la implicació d'una proteïna G en el procés de transducció des del receptor fins a l'enzim efector. Es va observar que certs odorífers no afectaven l'activitat de l'enzim, per la qual cosa ja aleshores es va proposar l'existència de mecanismes de transducció addicionals. Aquests experiments van rebre crítiques, ja que es requerien concentracions molt elevades d'odorífers (de l'ordre mil·limolar), molt superiors a les fisiològiques. Aquests problemes els va resoldre l'any 1990 el grup de Heinz Breer, quan en comptes de les aproximacions experimentals clàssiques va mesurar l'activació de l'adenilil ciclase en una escala temporal molt més reduïda, mitjançant l'ús de tècniques cinètiques de flux retinguts (*stopped flow*)^{31, 32} consistents en tres xeringues, la primera de les quals contenia la preparació de cilis; la segona, la molècula odorífera i, la tercera, una solució de terminació (tricloroacètic o perclòric), muntades en un dispositiu que podia mesclar els continguts de les dues primeres xeringues i després activar la tercera amb un

30. P. B. SKLAR, R. R. H. ANHOLT i S. H. SNYDER (1986). «The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants», *J. Biol. Chem.*, núm. 261, p. 15538-15543.

31. H. BREER, I. BOEKHOFF i E. TAREILUS (1990), «Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction», *Nature*, núm. 345, p. 65-68.

32. I. BOEKHOFF, E. TAREILUS, J. STROTMANN i H. BREER (1990), «Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants», *EMBO J.*, núm. 9, p. 2453-2458.

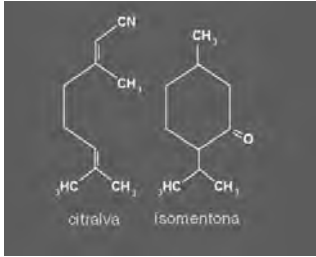


FIGURA 17. Estructures moleculars de la citralva i la isomentona.

desfasament d'entre 8 i 500 ms. En aquestes condicions, l'exposició de preparacions de cilis olfactoris a concentracions nanomolars de certs odorífers com

ara citralva (3,7-dimetil-2,6-octadienonitril) o isomentona (5-metil-2(1-metiletil)ciclohexa-nona) (fig. 17), que produeixen sensacions de llimona i menta, respectivament, induïa un augment molt ràpid de la concentració d'AMPC, que assolí un pic als 50 ms i tornava als nivells basals als 200-300 ms (fig. 18). Aquesta cinètica d'aparició del segon missatger precedeix clarament la resposta elèctrica (fig. 16). L'augment d'un 5-10 vegades sobre el nivell basal representa que la concentració d'AMPC quedaria per sobre de la constant de dissociació (Kd) del nucleòtid i el canal iònic activat per AMPC (vegeu-ho més endavant), amb la qual cosa la resposta bioquímica observada podria perfectament ésser la responsable de la generació del senyal elèctric.³³

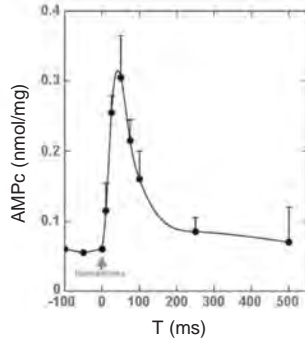


FIGURA 18. Acumulació ràpida d'AMPC en cilis olfactoris de rata com a resposta a isomentona. De H. Breer *et al.* (1990), *Nature*, núm. 345, p. 65-68.

33. S. FRINGS, J. W. LYNCH i B. LINDEMANN (1992), «Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage», *J. Gen. Physiol.*, núm. 100, p. 45-67.

Les corbes concentració-efecte d'odorífers s'han analitzat detalladament per al cas de la citralva: un cop transformades per la linearització de Hofstee, mostren la presència de dos components, un d'alta potència amb EC_{50} (concentració d'agonista que dóna el 50 % de l'efecte màxim) en l'ordre nanomolar i un altre de baixa potència, amb valors d' EC_{50} micromolars.³⁴ El primer pot semblar afavorit per receptors específics, mentre que el segon, que dóna una resposta tònica que no es dessensibilitza com la d'alta potència (fig. 18), és degut probablement a interaccions inespecífiques. L'especificitat del primer component mostra tots els requeriments experimentals d'un procés afavorit per una proteïna G heterotrimerica:

— L'efecte de l'odorífer és reproduït per l'ió fluoroaluminat (AlF_4^-), que mimetitza el tercer fosfat del GTP en interactuar amb el GDP unit a la proteïna G, dissociant-la i activant-la.^{35, 36}

— L'efecte de l'odorífer és estrictament dependent de la presència de GTP i un sistema regenerador del nucleòtid, o d'anàlegs resistent a la hidròlisi, com ara GTP γ S o GppNHp.

— L'efecte és inhibït per GDP β S, anàleg del GDP que competeix amb el GTP o els seus anàlegs, inactivant la proteïna G.

— Finalment, la producció d'AMPc queda permanentment activada després d'un tractament amb la toxina de

34. I. BOEKHOFF, E. TAREILUS, J. STROTMANN i H. BREER (1990), «Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants», *EMBO J.*, núm. 9, p. 2453-2458.

35. A. G. GILMAN (1987), «G proteins: transducers of receptor-generated signals», *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 56, p. 615-649.

36. J. BIGAY, P. DETERRE, C. PFISTER i M. CHABRE (1985), «Fluoroaluminates activate transducin-GDP by mimicking the gamma-phosphate of GTP in its binding site», *FEBS Lett.*, núm. 191, p. 181-185.

Vibrium cholerae, que ADP-ribosila la subunitat α de les proteïnes G de la família G_s i n'impedeix la reassociació amb el complex $\beta\gamma$.³⁷

- Proteïna G_{olf}

El tipus de proteïna G que afavoreix l'acoblament entre els receptors i l'adenil ciclase en els cilis olfactoris s'ha caracteritzat com una variant de G_s , denominada G_{olf} per D. T. Jones i R. R. Reed.³⁸ Aquests autors havien mirat d'identificar prèviament la proteïna G olfactiva hibridant DNA d'una genoteca de teixit olfactiv amb una sonda dirigida contra una zona molt conservada de les subunitats α de les proteïnes G, i van identificar DNA codificant per a $G\alpha_s$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{12}$ i $G\alpha_{13}$.³⁹ No obstant això, malgrat que l'mRNA de G_s és molt abundant en l'epiteli olfactiv, van demostrar que s'expressava en cèl·lules no neuronals: després d'extirpar *in vivo* el bulb olfactiv, amb la qual cosa al cap de sis o vuit dies les neurones sensibles de l'epiteli degeneren, continuaven detectant per hibridació *in situ* el mateix nivell de mRNA de G_s , per la qual cosa aquesta no podia ésser la proteïna buscada.

En una altra sèrie d'experiments⁴⁰ van fer servir una sonda totalment degenerada, hibridant en condicions de

37. I. BOEKHOFF, E. TAREILUS, J. STROTMANN i H. BREER (1990), «Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants», *EMBO J.*, núm. 9, p. 2453-2458.

38. D. T. JONES i R. R. REED (1989), «Golf: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction», *Science*, núm. 244, p. 790-795.

39. D. T. JONES i R. R. REED (1987), «Molecular cloning of five GTP-binding protein cDNA species from rat olfactory neuroepithelium», *J. Biol. Chem.*, núm. 262, p. 14241-14245.

40. D. T. JONES i R. R. REED (1989), «Golf: An olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction», *Science*, núm. 244, p. 790-795.

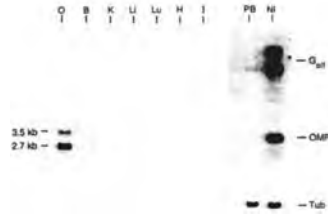


FIGURA 19. Esquerra: expressió de l'mRNA de G_{olf} en diversos teixits (O, epiteli olfatori; B, cervell; K, ronyó; Li, fetge; Lu, pulmó; H, cor; I, intestí). Dreta: efecte de la bulbectomia sobre l'expressió de l'mRNA de G_{olf} en l'epiteli olfatori (NI, animals control; PB, RNA aïllat d'animals bulbectomitzats; OMP, proteïna marcador olfàctòria; Tub, tubulina). De D. T. Jones i R. R. Reed (1989), *Science*, núm. 244, p. 790-795.

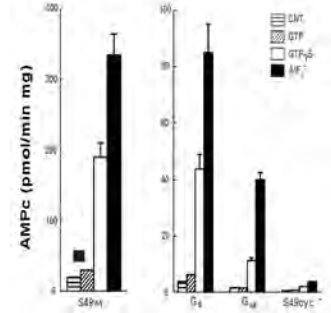


FIGURA 20. Activitat adenilil ciclasa en membranes de cèl·lules S49 (esquerra) i S49cyc⁻ control o transfectades amb G_{α_s} , o amb $G_{\alpha_{olf}}$ (dreta). De D. T. Jones i R. R. Reed (1989), *Science*, núm. 244, p. 790-795.

baixa astringència. Després d'eliminar els clons que hibridaven en condicions d'alta astringència amb els DNA identificats prèviament, van identificar una nova proteïna G, la G_{olf} , molt similar (88 % d'identitat) a G_s . Aquesta G_{olf} , a diferència de G_s , s'expressa únicament en l'epiteli olfatori, i la bulbectomia elimina totalment la seva expressió (fig. 19). Per a demostrar la funcionalitat de G_{olf} , la van expressar en la línia cel·lular S49 cyc⁻, que conté adenilil ciclasa però no és estimulada per agonistes en estar mancada de G_s :⁴¹ en aquestes cèl·lules, igual com en cèl·lules transfectades amb G_s , es va reconstruir el fenotip cyc⁺, ja que tant el GTP γ S com el fluoroaluminat estimulaven l'activitat adenilil ciclasa (fig. 20).

41. T. HAGA, E. M. ROSS, H. J. ANDERSON i A. G. GILMAN (1977), «Adenylate cyclase permanently uncoupled from hormone receptors in a novel variant of S49 mouse lymphoma cells», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 74, p. 2016-2020.

- Adenilil ciclasa III

Semblantment a l'especificitat de G_{olf} , l'adenilil ciclasa dels cilis olfactoris també és un isoenzim específic de la transducció olfactiva. L'enzim, denominat *adenilil ciclasa III*, fou identificat pel grup de Randall Reed en genotèques d'epiteli olfactori mitjançant hibridació en condicions de baixa astringència amb sondes basades en la seqüència de l'adenilil ciclasa I.⁴² L'isoenzim olfactori és semblant als altres tipus d'adenilil ciclases de membrana:^{43, 44} totes consten d'una mica més d'un miler d'aminòacids, amb dos dominis altament hidrofòbics (M1 i M2), els quals podrien constar cada un de sis regions que travessarien la membrana (fig. 21); aquestes regions mostren una alta diversitat de seqüència entre tots els isoenzims. Entre els dos dominis hidrofòbics, així com a la posició N-terminal, es localitzen dos dominis citoplasmàtics (C1 i C2), en els quals resideix l'activitat catalítica, i la seva seqüència es conserva força entre tots els tipus de ciclases. Pel que fa als mecanismes d'activació de l'adenilil ciclasa III, aquesta és activada *in vitro* per les subunitats α de G_s i G_{olf} , igual que la resta de ciclases; semblantment a la

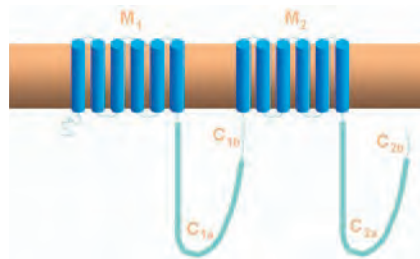


FIGURA 21. Estructura de les adenilil ciclases de membrana. De W.-J. Tang i A. G. Gilman (1992), *Cell*, núm. 70, p. 869-872.

42. H. A. BAKALYAR i R. R. REED (1990), «Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection», *Science*, núm. 250, p. 1403-1406.

43. R. T. TAUSSIG i A. G. GILMAN (1995), «Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases», *J. Biol. Chem.*, núm. 270, p. 1-4.

44. W. J. TANG i A. G. GILMAN (1992), «Adenylyl cyclases», *Cell*, núm. 70, p. 869-872.

TAULA 2
Regulació dels isoenzims de l'adenilil ciclasa per diferents subunitats de les proteïnes G i per calci

Isoenzim	G- α_s	G- α_i	G- $\beta\gamma$	Ca ²⁺	PKC
I	+	-	-	+(CAM)	0
II	+	0	+(α_s)	0	+
III	+	?	0	+(CAM)	0
IV	+	?	+(α_s)	0	0
V	+	-	0	-	(α , δ)
VI	+	-	0	-	(α , δ)
VII	+	?	0	+(CAM)	0

ciclasa I, també resulta activada per calci / calmodulina⁴⁵ i no és afectada per la proteïna cinasa C (taula 2).

- Canal regulat per AMPc

El paper funcional de l'AMPc en el procés de transducció quimioelèctrica va quedar clar quan, mitjançant tècniques d'enregistrament de corrents individuals en pedaçes de membrana (*patch clamp*), es van caracteritzar en la membrana dels cilis olfactoris canals activats específicament pel nucleòtid.⁴⁶ Aquests canals s'assemblen molt funcionalment als dels fotoreceptors:⁴⁷ en primer lloc, en tots dos casos, el GMPc mostra més potència (unes 30-40 vegades) que l'AMPc (fig. 22), si bé el canal olfactori és 25 vegades més sensible a ambdós nucleòtids que el retinià (fig. 22). En segon lloc, tots

45. E.-J. CHOI, Z. XIA i D. R. STORM (1992), «Stimulation of the type III olfactory adenylyl cyclase by calcium and calmodulin», *Biochemistry*, núm. 31, p. 6492-6498.

46. T. NAKAMURA i G. H. GOLD (1987), «A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia», *Nature*, núm. 325, p. 442-444.

47. W. ALTENHOFEN, J. LUDWIG, E. EISMAN, W. KRAUS, W. BÖNJK i U. B. KAUPP (1991), «Control of ligand specificity in cyclic nucleotide-gated channels from rod photoreceptors and olfactory epithelium», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, p. 9868-9872.

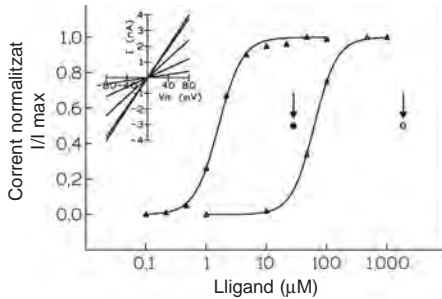


FIGURA 22. Activació d'un corrent en pegats de cilis olfactoris per diverses concentracions d'AMPc (Δ) o GMPc (\blacktriangle). Els cercles mostren l'EC50 d'aquests dos nucleòtids per a l'activació del canal retinià. El gràfic inserit representa relacions intensitat-voltatge en presència de diferents concentracions d'AMPc, de manera que el pendent (conductància) és funció d'[AMPc]. Noteu que totes les rectes passen per l'origen, cosa que indica que el potencial de reversió del corrent és 0 mV. De T. Nakamura i G. H. Gold (1987), *Nature*, núm. 325, p. 442-444.

dos canals mostren selectivitat per a cations, és a dir, quan estan oberts deixen passar Na^+ , Ca^{2+} i K^+ , com ho demostra el fet que els potencials de reversió dels corrents s'aproximen a 0 mV quan s'empren solucions fisiològiques a tots dos costats de la membrana (fig. 22). Finalment, ambdós canals mostren un elevat grau d'homologia en la seqüència, ja que un 74 % de les posicions estan ocupades en tots dos per aminoàcids idèntics o conservats (fig. 23). Aquesta darrera característica és la que va permetre clonar-lo i seqüenciar-lo de manera independent per dos grups, un dels quals liderats per Randall Reed,^{48, 49}

48. J. LUDWIG, T. MARGALIT, E. E. EISMAN, D. LANCET i U. B. KAUPP (1990), «Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium», *FEBS Lett.*, núm. 270, p. 24-29.

49. R. S. DHALLAN, K.-W. YAU, K. A. SCHRADER i R. R. REED (1990), «Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons», *Nature*, núm. 347, p. 184-187.

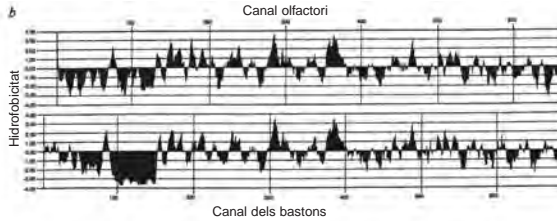


FIGURA 23. Comparació dels perfils d'hidrofobicitat dels canals olfatori (dalt) i visual (baix). De R. S. Dhallan *et al.* (1990), *Nature*, núm. 347, p. 184-187.

120

emprant sondes del fotoreceptor i hibridant genoteques olfàctòries: a partir del perfil hidrofòbic de la seqüència s'ha postulat que, igual que el canal dels fotoreceptors, consta de sis regions transmembranals, amb els extrems N-terminal i C-terminal al costat citoplasmàtic. Com altres components del sistema de transducció olfatori, l'expressió de l'mRNA del canal es limita a l'epiteli olfatori i, dins d'aquest, a les neurones olfàctòries.⁵⁰

Les dades experimentals exposades fins ara avalen el concepte d'un procés de transducció afavorit per AMPc en neurones olfàctòries: després de la interacció de molècules odoríferes amb receptors més o menys específics dels cilis, s'activa la proteïna G_{olf} , la subunitat α de la qual activa l'adenilil ciclase III. Quan la concentració d'AMPc assoleix un cert nivell, s'activen canals de la membrana selectius per a cations, amb la qual cosa el valor del potencial de membrana evolucionarà en la direcció del potencial de reversió del corrent (0 mV). A causa de la lenta cinètica d'inactivació dels canals olfatoris (fig. 24),

50. R. S. DHALLAN, K.-W. YAU, K. A. SCHRADER i R. R. REED (1990), «Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons», *Nature*, núm. 347, p. 184-187.

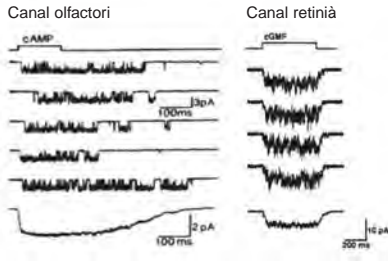


FIGURA 24. L'activitat del canal olfatori activat per nucleòtids cíclics persisteix durant diversos centenars de mil·lisegons un cop eliminat l'agonista. El darrer traç de cada sèrie correspon a la mitjana de 92 (esquerra) o 10 (dreta) registres amb el mateix pegat. De F. Zufall *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, p. 9335-9339.

aquests romanen oberts durant alguns centenars de mil·lisegons després que la concentració d'AMPc torni a nivells basals,⁵¹ fet que els diferencia clarament dels canals dels fotoreceptors i que explica la diferència temporal entre els canvis en la concentració intracel·lular d'AMPc induïda per odorífers (fig. 18) i l'aparició del corrent (fig. 16).

Generació d'inositol 1,4,5-trifosfat

Des de 1986 se sap que no tots els odorífers activen la generació d'AMPc, ja que alguns semblaven exercir els seus efectes a través de la generació d'un altre segon missatger intracel·lular, l'inositol 1,4,5-trifosfat (Ins1,4,5P₃).^{52, 53} Més

51. F. ZUFALL, H. HATT i S. FIRESTEIN (1993), «Rapid application and removal of second messengers to cyclic nucleotide-gated channels from olfactory epithelium», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, p. 9335-9339.

52. P. B. SKLAR, R. R. H. ANHOLT i S. H. SNYDER (1986), «The odorant-sensitive adenylate cyclase of olfactory receptor cells. Differential stimulation by distinct classes of odorants», *J. Biol. Chem.*, núm. 261, p. 15538-15543.

53. T. HUQUE i R. C. BRUCH (1986), «Odorant- and guanine nucleotide-stimulated phosphoinositide turnover in olfactory cilia», *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, núm. 137, p. 36-42.

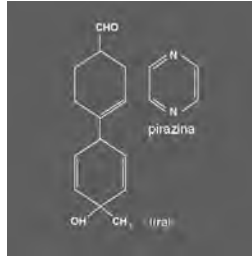


FIGURA 25. Estructura molecular del liral i la pirazina.

recentment s'ha comprovat que certs odorífers que no activen l'adenilil ciclasa, com el liral o la pirazina, que produeixen sensacions florals i de pebrot, respectivament (fig. 25), resulten ésser activadors de la fosfolipasa C.^{54, 55} Semblantment a l'aparició d'AMPc (fig. 17), la cinètica d'aparició de $\text{Ins}1,4,5\text{P}_3$ és també en l'escala de mil·lisegons.⁵⁶ A diferència del sistema de generació d'AMPc,

no es coneix ni la identitat de la proteïna G implicada en l'estimulació de la fosfolipasa C ni la identitat d'aquesta darrera. Se sap, malgrat tot, que el procés està vehiculat per una proteïna G de la família de les G_o/G_i , ja que l'efecte desapareix després d'un tractament dels cilis amb la toxina de *Bordetella pertussis*,⁵⁷ per la qual cosa totes dues cascades de senyalització semblen vehiculades per receptors amb distinta especificitat quant a la seva interacció amb proteïnes G. Si la proteïna G és de la família G_o/G_i , és molt probable que la fosfolipasa C implicada sigui l'isoenzim

54. I. BOEKHOFF, E. TAREILUS, J. STROTMANN i H. BREER (1990), «Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants», *EMBO J.*, núm. 9, p. 2453-2458.

55. G. V. RONNET, H. CHO, L. D. LESTER, S. F. WOOD i S. H. SNYDER (1993), «Odorants differentially enhance phosphoinositide turnover and adenylyl cyclase in olfactory receptor neuronal cultures», *J. Neurosci.*, núm. 13, p. 1751-1758.

56. I. BOEKHOFF, E. TAREILUS, J. STROTMANN i H. BREER (1990), «Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants», *EMBO J.*, núm. 9, p. 2453-2458.

57. I. BOEKHOFF, E. TAREILUS, J. STROTMANN i H. BREER (1990), «Rapid activation of alternative second messenger pathways in olfactory cilia from rats by different odorants», *EMBO J.*, núm. 9, p. 2453-2458.

β -2,⁵⁸ un tipus que, en comptes d'activar-se per la subunitat α de la proteïna G, s'activa mitjançant interacció directa amb les subunitats $\beta\gamma$.⁵⁹

La rellevància fisiològica de l'activació d'una fosfolipasa C com a sistema de transducció del senyal olfatori ve reforçada per la presència, en cilis olfactoris, d'un lloc de fixació de Ins1,4,5P_3

d'alta afinitat i amb un perfil farmacològic similar al receptor de Ins1,4,5P_3 intracel·lular.⁶⁰ Aquest tipus de fixació sembla ésser un canal que, a diferència de l'intracel·lular, que és selectiu per a Ca^{2+} , permet el pas de cations en general, ja que genera corrents amb potencials de reversió de 0 mV, igual que el canal olfatori activat per nucleòtids cíclics (fig. 26).

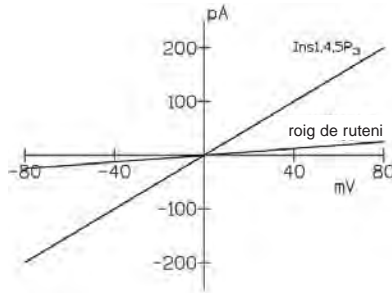


FIGURA 26. Conductància estimulada per Ins1,4,5P_3 en membranes de cilis de neurones olfàctories de rata incorporades en bicapes fosfolipídiques. De D. Restrepo *et al.* (1992), *Am. J. Physiol.*, núm. 263, p. C667-C673.

58. S. COCKCROFT i G. M. H. THOMAS (1992), «Inositol-lipid-specific phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors», *Biochem. J.*, núm. 288, p. 1-14.

59. M. CAMPS, C. HOU, K. H. JAKOBS i P. GIERSHIK (1990), «Guanosine 5'-[gamma-thio]triphosphate-stimulated hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in HL-60 granulocytes. Evidence that the guanine nucleotide acts by relieving phospholipase C from an inhibitory constraint», *Biochem. J.*, núm. 271, p. 743-748.

60. D. RESTREPO, J. H. TEETER, E. HONDA, A. G. BOYLE, J. F. MARECEK, G. D. PRESTWICH i L. KALINOSKI (1992), «Evidence for an InsP_3 -gated channel protein in isolated rat olfactory cilia», *Am. J. Physiol.*, núm. 263, p. C667-C673.

Les neurones olfàctòries són capaces de discriminar polsos estimuladors de molècules odoríferes subministrats amb freqüències de fins a 10 Hz (10 s^{-1}).⁶¹ Un requisit essencial perquè les neurones reaccionin d'aquesta manera a l'estimulació iterativa és que la seva resposta sigui ràpida i transitòria. La base bioquímica d'aquest comportament són els canvis pulsatius en les concentracions dels segons missatgers generats (fig. 18). Atès que la cinètica d'augment del segon missatger (temps en què s'assoleix la meitat de l'efecte màxim) és molt similar per a un ampli interval de concentracions de l'estímul odorífer,⁶² la rapidíssima dessensibilització de la resposta (en les respostes a hormones o neurotransmissors aquesta es dona en una escala de minuts)⁶³ és molt difícilment atribuïble a la inactivació de l'odorífer per als enzims específics de l'epiteli olfatori (UDP-glucuronil transferasa olfàctòria i el citocrom P450 olfatori).^{64, 65} El fenomen, estudiat principalment pel grup de Heinz Breer, és comú a molts sistemes de transducció de senyals, i sembla respondre a la fosforilació de components del sistema, com ha estat demostrat per als receptors mateixos en el cas

61. H. BREER, K. RAMING i J. KRIEGER (1994), «Signal recognition and transduction in olfactory neurons», *Biochim. Biophys. Acta*, núm. 1224, p. 277-287.

62. H. BREER, I. BOEKHOFF i E. TAREILUS (1990), «Rapid kinetics of second messenger formation in olfactory transduction», *Nature*, núm. 345, p. 65-68.

63. M. SHEAR, P. A. INSEL, K. L. MELMON i P. COFFINO (1976), «Agonist-specific refractoriness induced by isoproterenol. Studies with mutant cells», *J. Biol. Chem.*, núm. 251, p. 7572-7576.

64. D. LAZARD, K. ZUPKO, Y. PORIA, P. NEF, J. LAZAROVITS, S. HORN, M. KHEN i D. LANCET (1991), «Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase», *Nature*, núm. 349, p. 790-793.

65. P. NEF, J. HELDMAN, D. LAZARD, T. MARGALIT, M. JAYE, I. HANUKOGLU i D. LANCET (1989), «Olfactory-specific cytochrome P-450», *J. Biol. Chem.*, núm. 264, p. 6780-6785.

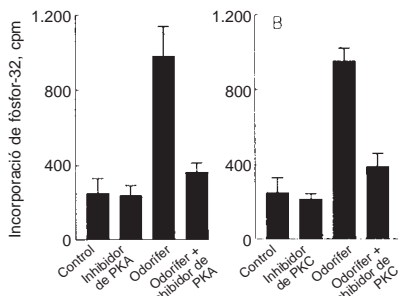


FIGURA 27. La fosforilació de proteïnes cilials induïda per odorífers es bloqueja en presència d'inhibidors de la PKA (esquerra) i de la PKC (dreta). De I. Boekhoff *et al.* (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, p. 11983-11987.

de la rodopsina i el receptor β -adrenèrgic.⁶⁶ Experiments en preparacions de cilis olfatoris de rata han demostrat que els odorífers que estimulen l'adenilil ciclasa induïxen una fosforilació de proteïnes que és sensible a inhibidors de la proteïna cinasa A (PKA); per contra, els odorífers que estimulen la fosfolipasa C també induïxen

fosforilació de proteïnes, però aquesta és bloquejada per inhibidors de la proteïna cinasa C o PKC (fig. 27).⁶⁷ Únicament es fosforila una banda de proteïna identificable per electroforesi en SDS, de PM 50.000, malgrat que no s'ha demostrat si es tracta del receptor. Encara més, aquesta fosforilació es correspon amb el procés de dessensibilització del senyal, en el qual hi ha implicades la PKA i la PKC, segons si es tracta de la via de senyalització d'AMPc o del Ins1,4,5P₃, ja que, en presència d'inhibidors de PKA o PKC, les respostes d'AMPc o Ins1,4,5P₃ als odorífers apropiats no es dessensibilitzen (fig. 28).⁶⁸

66. R. J. LEFKOWITZ, W. P. HAUSDORFF i M. G. CARON (1990), «Role of phosphorylation in desensitization of the beta-adrenoceptor», *Trends Pharmacol. Sci.*, núm. 11, p. 190-194.

67. I. BOEKHOFF, S. SCHLEICHER, J. STOTMAN i H. BREER (1992), «Odor-induced phosphorylation of olfactory cilia proteins», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, p. 11983-11987.

68. I. BOEKHOFF i H. BREER (1992), «Termination of second messenger signaling in olfaction», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, p. 471-474.

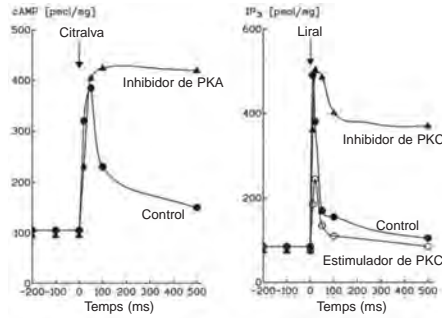


FIGURA 28. La inhibició de la PKA (esquerra) o de la PKC (dreta) bloqueja la dessensibilització de la generació de segons missatgers en cilis olfactoris. De I. Boekhoff i H. Breer (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 89, p. 471-474.

Ara bé, la PKA i la PKC no són les úniques cinases implicades en la dessensibilització del senyal olfatori. Existeix una família de proteïnes cinases que fosforila de manera específica receptors de la família de set dominis transmembranals, denominades *cinases de receptors acoblats a proteïnes G* (*G-protein-coupled receptor kinases* o GRK), també anomenades β ARK (β -adrenergic receptor kinase), pel fet que aquesta és la primera que es va caracteritzar.⁶⁹ Aquestes cinases inclouen la rodopsina cinasa o GRK-1 i dues isoformes de la β ARK (GRK-2 i GRK-3), i, a diferència de les cinases activades per segons missatgers, tenen la propietat de fosforilar específicament els receptors en la seva conformació activa o estimulada. Després de la fosforilació del receptor, que s'acostuma a donar en el tercer bucle citoplasmàtic (el que interactua amb la subunitat α de la proteïna G), el receptor és reconegut per una segona proteïna, denominada *arrestina* en el sistema visual i β -*arrestina* en els sistemes on intervé la β ARK. La interacció de l'arrestina amb el receptor fosforilat és precisament allò que impedeix l'activació de la proteïna G pel receptor, de manera que finalitza el senyal.

69. R. J. LEFKOWITZ (1993), «G protein-coupled receptor kinases», *Cell*, núm. 74, p. 409-412.

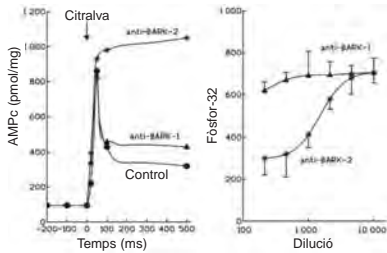


FIGURA 29. Tant la dessensibilització del senyal de l'AMPc (esquerra) com la fosforilació de proteïnes (dreta) en cilis olfactoris es bloqueja en presència d'anticossos policlonals específics anti- β ARK-2 (GRK-3). De S. Schleicher *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, p. 1420-1424.

olfactòries a diferència de la β ARK-1 (GRK-2),⁷¹ ja que la preincubació en presència d'un antisèrum dirigit contra β ARK-2 és molt més eficaç per a bloquejar la dessensibilització i la fosforilació de proteïnes ciliars (fig. 29).⁷² Més recentment, s'han degenerat soques de ratolins amb disrupció del gen (*knockout*) de GRK-3.⁷³ A diferència de la disrupció

En preparacions de cilis olfactoris, la dessensibilització de les respostes tant d'AMPc com de Ins 1,4,5P₃ es bloqueja totalment en presència d'heparina, un inhibidor relativament específic de l'activitat β ARK.⁷⁰ Aquesta activitat sembla estar relacionada amb el subtipus β ARK-2 (GRK-3), un isoenzim molt enriquit en els cilis de les neurones

70. S. SCHLEICHER, I. BOEKHOFF, J. ARRIZA, R. J. LEFKOWITZ i H. BREER (1993), «A β -adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, p. 1420-1424.

71. T. M. DAWSON, J. L. ARRIZA, D. E. JAWORSKY, F. F. BORISY, H. ATTRAMADAL, R. J. LEFKOWITZ i G. V. RONNETT (1993), « β -Adrenergic receptor kinase-2 and β -arrestin-2 as mediators of odorant-induced desensitization», *Science*, núm. 259, p. 825-829.

72. S. SCHLEICHER, I. BOEKHOFF, J. ARRIZA, R. J. LEFKOWITZ i H. BREER (1993), «A β -adrenergic receptor kinase-like enzyme is involved in olfactory signal termination», *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, p. 1420-1424.

73. K. PEPPER, I. BOEKHOFF, P. McDONALD, H. BREER, M. C. CARON i R. J. LEFKOWITZ (1997), «G protein-coupled receptor kinase 3

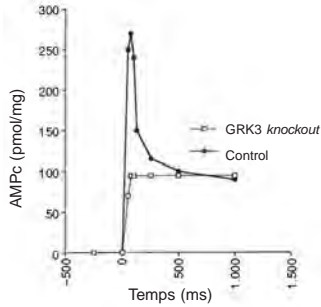


FIGURA 30. Generació d'AMPc en cilis olfactoris de ratolins control i sense GRK-3. De K. Peppel *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.*, núm. 272, p. 25425-25428.

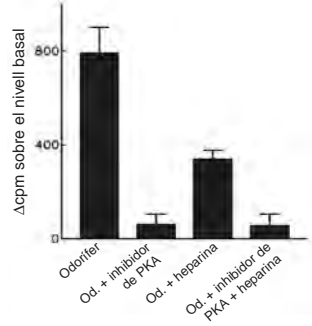


FIGURA 31. La inhibició de GRK-3 per heparina redueix només parcialment la fosforilació de proteïnes ciliars induïda per odorífers. De S. Schleicher *et al.* (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, p. 1420-1424.

del gen de GRK-2, que produeix fetus inviables, els ratolins sense GRK-3 tenen un desenvolupament embrionari i post-natal normal. En preparacions de cilis olfactoris d'aquests animals, l'augment dels nivells d'AMPc en resposta a odorífers no mostra dessensibilització (fig. 30), tot i que el sistema G_{olf} -adenilciclasa mostra menys eficàcia en la generació del segon missatger.

Tots dos tipus de proteïna cinasa, les dependents de segons missatgers (PKA i PKC) i la β ARK-2 semblen operar de manera concertada en el procés de dessensibilització olfactiva. Si es compara l'efecte de la inhibició d'aquestes cinases sobre *a*) la dessensibilització de la resposta, d'una banda, i sobre *b*) el grau de fosforilació de proteïnes ciliars, de l'altra, s'observa que la inhibició de les cinases activades

(GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization», *J. Biol. Chem.*, núm. 272, p. 25425-25428.

per segons missatgers resulta en el bloqueig total d'ambdós aspectes, dessensibilització i fosforilació (fig. 27 i 28). Per contra, la inhibició de la GRK-3 per heparina o anticossos bloqueja totalment la dessensibilització (fig. 29), però sols redueix parcialment la fosforilació (fig. 31). Atès que la fosforilació produïda ja sigui per PKA o per PKC (dependent del segon missatger que vehiculi la resposta a l'odorífer en concret) continua en presència d'heparina o anticossos anti-GRK-3, és clar que és insuficient per a provocar la dessensibilització. Així, és probable que tots dos tipus de cinasa hagin d'actuar d'una manera seqüencial en una cascada iniciada per l'activació de les cinases dependents de segons missatgers. Encara no es coneix detalladament com interactuen aquestes cinases, tot i que el més probable és que PKA o PKC fosforilin el receptor, i d'aquesta manera exposin llocs específics del receptor a l'acció de la GRK-3, que sembla activar-se i translocar-se a la membrana en interactuar amb les subunitats $\beta\gamma$ de la proteïna G_{olf} .⁷⁴ Aquest mecanisme de dessensibilització és aparentment específic del sistema olfatori, atès que en altres models coneguts, com la retina o el receptor β -adrenèrgic, una única cinasa (rodopsina cinasa o GRK-1) desacobla el receptor de la proteïna G (transducina), en el primer cas, mentre que en el segon és l'acció en paral·lel de la PKA i la β ARK-1 (GRK-2) la que finalitza la interacció del receptor i la proteïna G_s .^{75, 76}

74. I. BOEKHOFF, J. INGLESE, S. SCHLEICHER, W. J. KOCH, R. J. LEFKOWITZ i H. BREER (1994), «Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by $\beta\gamma$ -subunits of heterotrimeric G proteins», *J. Biol. Chem.*, núm. 269, p. 37-40.

75. D. LAZARD, K. ZUPKO, Y. PORIA, P. NEF, J. LAZAROVITS, S. HORN, M. KHEN i D. LANCET (1991), «Odorant signal termination by olfactory UDP glucuronosyl transferase», *Nature*, núm. 349, p. 790-793.

76. L. STRYER (1986), «Cyclic GMP cascade of vision», *Annu. Rev. Neurosci.*, núm. 9, p. 87-119.

Després del repàs que acabem d'exposar sobre les diferents famílies de receptors de molècules odoríferes i els seus mecanismes de transducció, pot fer l'efecte erroni que es coneix amb un cert detall la base molecular del sentit de l'olfacte. És cert que fins a un cert punt es coneix què s'esdevé des que la molècula odorífera és inhalada fins que la neurona sensorial canvia la freqüència dels seus potencials d'acció, però això no és la percepció d'una olor. Exactament igual que amb tots els sentits, l'encarregat d'ensumar és el cervell, no pas l'epiteli olfatori, i amb les aproximacions clàssiques de l'estil «dividir per regnar», és a dir, homogeneïtzar, fraccionar, purificar, no es pot arribar gaire més enllà del que ja s'ha exposat, ja que l'objecte d'estudi —el cervell— funciona a un nivell d'integració que requereix l'estudi de l'arquitectura de les seves connexions. En aquest sentit, en els darrers deu anys s'han assolit importants progressos per a desentranyar com el sistema olfatori organitza els senyals generats per un miler de receptors diferents en l'epiteli olfatori. Aquesta sèrie de treballs constitueixen el segon gran èxit de Richard Axel i Linda B. Buck.

Experiments d'hibridació *in situ* amb sondes per a dotze OR diferents han permès de definir en l'epiteli olfatori de rata quatre zones en les quals s'expressen diferents grups de receptors d'odorífers d'una manera reproducible entre diferents individus (fig. 32).^{77, 78} Ara bé, dins de cada una de les quatre zones, les neurones que expressen un deter-

77. R. VASSAR, J. NGAI i R. AXEL (1993), «Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium», *Cell*, núm. 74, p. 309-318.

78. J. STROTMANN, I. WANNER, T. HELFRICH, A. BECK i H. BREER (1994), «Rostro-caudal patterning of receptor-expressing olfactory neurons in the rat nasal cavity», *Cell Tissue Res.*, núm. 278, p. 11-20.

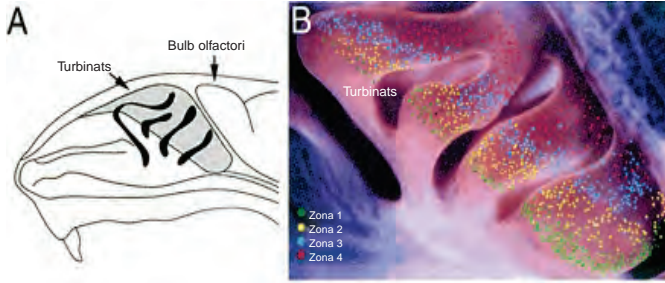


FIGURA 32. a) Esquema de la cavitat nasal de rata, que mostra en gris la zona sensible de l'epiteli; b) resum esquemàtic de les quatre zones d'expressió de receptors d'odorífers en l'epiteli olfatori. Codis: verd, expressió dels OR F12, F23, I7, I9 i J2; groc, expressió de F3 i F5; blau, expressió de F6, J7 i J14; vermell, expressió de M12 i M70. De Vassar *et al.* (1993), *Cell*, núm. 74, p. 309-318.

minat receptor semblen distribuir-se a l'atzar. Experiments similars d'hibridació *in situ*, que indicaven que cada gen d'OR s'expressa aproximadament en una de cada mil neurones sensorials de l'epiteli nasal de rata,⁷⁹ van permetre d'avançar la hipòtesi de treball que sosté que cada neurona expressa únicament un gen d'OR. Aquesta hipòtesi s'ha reforçat amb l'evidència que, després de l'anàlisi mitjançant RT-PCR de diverses neurones individuals, cada cèl·lula expressa un sol tipus d'OR.^{80, 81}

131

79. K. J. RESSLER, S. L. SULLIVAN i L. B. BUCK (1993), «A zonal organization of odorant receptor gene expression in the olfactory epithelium», *Cell*, núm. 73, p. 597-609.

80. Un article comunica, no obstant això, l'existència de neurones en l'epiteli olfatori de rata que expressen dos OR diferents. Es tracta de N. E. RAWSON, J. EBERWINE, R. DORSON, J. JACKSON, P. ULRICH i D. RESTREPO (2000), «Expressions of mRNAs encoding for two different olfactory receptors in a subset of olfactory receptor neurons», *J. Neurochem.*, núm. 75, p. 185-195.

81. B. MALNIC, J. HIRONO, T. SATO i L. B. BUCK (1999), «Combinatorial receptor codes for odors», *Cell*, núm. 96, p. 713-723.

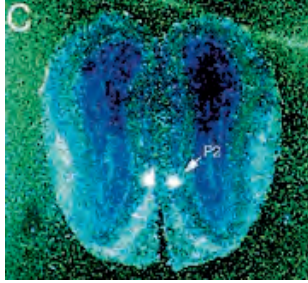


FIGURA 33. Autoradiografia superposada a una secció coronal dels bulbs olfactoris de ratolí després d'hibridar *in situ* amb una sonda específica per a l'OR P2. La fletxa indica els dos glomèruls cap als quals convergeixen els axons de les neurones que expressen l'OR P2. De P. Mombaerts *et al.* (1996), *Cell*, núm. 87, p. 675-686.

Com pot un animal obtenir informació referent a la qualitat d'una olor quan el seu receptor s'expressa en una àrea equivalent al 25 % de la superfície total de l'epiteli, i quan aquesta zona d'expressió és compartida amb més d'un centenar d'altres receptors? La resposta a aquesta pregunta sembla que radica en l'organització de les projeccions axòniques des de l'epiteli fins al bulb olfatori. Experiments d'hibridació *in situ* amb sondes marcades amb ^{33}P específiques per a diferents OR mostren que, malgrat que cada receptor s'expressa en moltes neurones receptores, tots els axons convergeixen en un sol glomèrul del bulb ipsilateral (fig. 33).⁸² Aquests resultats mostren que els axons de les neurones que expressen un determinat OR convergeixen en el mateix glomèrul, ja que posen de manifest que els RNA missatgers de l'OR es troben, no solament en el soma i en els cilis neuronals, sinó que també es troben en els terminals axònics. La convergència dels axons de neurones receptores que expressen el mateix OR en el mateix glomèrul del bulb olfatori la va demostrar el grup de Richard Axel d'una manera realment espectacular mitjançant una estratègia de substitució gèni-

82. P. MOMBAERTS, F. WANG, C. DULAC, S. K. CHAO, A. NEMES, M. MENDELSON, J. EDMONSON i R. AXEL (1996), «Visualizing an olfactory sensory map», *Cell*, núm. 87, p. 675-686.

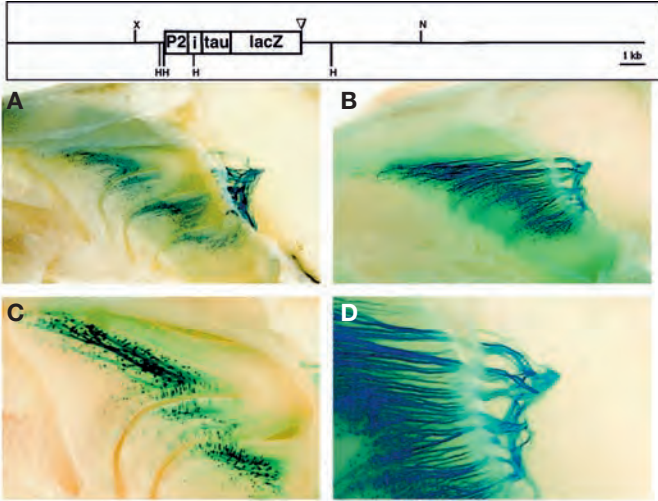


FIGURA 34. Dalt: esquema del locus P2 modificat amb una seqüència IRES (i) i la proteïna de fusió tau-lacZ; X, H i N són llocs de restricció per XhoI, HindI i NcoI. *a-d*: Fotografies, revelades amb el cromogen X-gal (5-Br, 4-Cl, 3-indolil, β -D-galactosodi), de la cavitat nasal i de la zona mitjana del bulb olfatori d'un ratolí P2-tau-lacZ. Les neurones sensorials que expressen l'OR P2 estan totes distribuïdes per la zona 3 de l'epiteli (*a* i *c*), mentre que els seus axons convergeixen en un únic glomèrul (*a*, *b*, *d*). De P. Mombaerts *et al.* (1996), *Cell*, núm. 87, p. 675-686.

ca.⁸³ Per mitjà de la mutagènesi dirigida en la línia germinal de ratolins, el locus de l'OR P2 es va modificar (fig. 34) inserint immediatament darrere del seu codó de terminació una seqüència IRES (*internal ribosome entry site*) del virus de l'encefalomielitis, seguida de la seqüència que codifica tau-lacZ, una proteïna de fusió entre la proteïna associada a

83. P. MOMBAERTS, F. WANG, C. DULAC, S. K. CHAO, A. NEMES, M. MENDELSON, J. EDMONSON i R. AXEL (1996), «Visualizing an olfactory sensory map», *Cell*, núm. 87, p. 675-686.

microtúbuls i la β -galactosidasa, que es transporta d'una manera eficaç al llarg de dendrites i axons neuronals. Així es va aconseguir la transcripció d'un mRNA bicistrònic que permet la traducció del receptor P2 juntament amb tau-lacZ. En aquesta soca de ratolins, les neurones olfàctòries que transcriuen l'alel modificat P2 també expressen tau-lacZ en els seus axons, i permeten de visualitzar el patró de projecció cap al bulb olfatori. Aquests estudis van demostrar que el patró de convergència axònic és absolut: no es van observar axons de neurones que expressen PS que projecten de manera difusa, sinó que tots van al mateix glomèrul d'entre els mil vuit-cents que hi ha al bulb (fig. 34).

Aquests experiments demostren que, atès que cada cèl·lula mitral del bulb olfatori està relacionada amb un únic glomèrul, la segregació de l'entrada d'informació, que en l'epiteli ve condicionada per la identitat de l'OR estimulat, es perpetua en el primer relleu sinàptic en forma de la identitat de la cèl·lula mitral que transmet la informació a centres superiors.

En ciència ocorre de manera invariable que respostes a velles preguntes generen moltes més preguntes. Així, el fet que totes les neurones que expressen el mateix OR convergeixin sobre la mateixa cèl·lula mitral planteja el problema de com ho aconsegueixen. Sorprenentment, sembla que el mateix receptor, que s'expressa en els cilis exposats a la cavitat nasal, exerceix una funció fonamental sobre el procés de guia dels axons en creixement.⁸⁴ Ja els resultats de la figura 33 indiquen que els RNA missatgers dels OR també es troben en els terminals axònics. La importància de la identitat de l'OR que s'expressi en cada neurona a l'hora de guiar el seu

84. F. WANG, A. NEMES, M. MENDELSON i R. AXEL (1998), «Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map», *Cell*, núm. 93, p. 47-60.

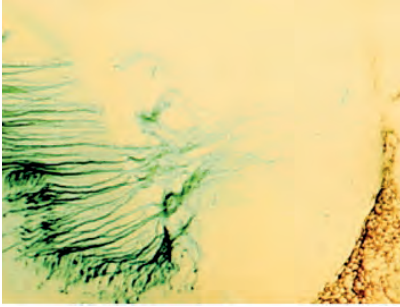


FIGURA 35. La deleció del receptor P2 impedeix la convergència dels axons sobre un únic glomèrul. De F. Wang *et al.* (1998), *Cell*, núm. 93, p. 47-60.

axó cap a un determinat glomèrul la van revelar experiments similars als descrits anteriorment: en aquest cas es van generar ratolins que coexpressen tau-lacZ amb l'OR P2, però la seva regió codificant s'havia eliminat. En aquests animals, les neurones expressen tau-lacZ però no l'OR P2, i els seus axons, un cop són al bulb olfatori, apareixen clarament dispersos sense convergir (fig. 35). No solament cal que s'expressi un OR perquè els axons convergeixin, sinó que la identitat de l'OR és fonamental perquè la convergència es doni sobre una zona o altra del bulb. Això ha estat demostrat en experiments en què la regió codificadora de l'OR P2, en comptes d'ésser eliminada, es va substituir per la d'un altre OR diferent (fig. 36).⁸⁵

Malgrat que la família de gens receptors olfactoris és amplíssima, els humans som capaços de distingir força més de dues-centes olors, per la qual cosa no sembla que cada OR sigui específic per a una i únicament una molècula odorífera. D'altra banda, la sensació subjectiva d'una aroma és global, de manera que l'olor de cigarreta rossa, de pebrots fregits o de Channel número 5 es percep com una aroma única, tan

85. F. WANG, A. NEMES, M. MENDELSONH I R. AXEL (1998), «Odorant receptors govern the formation of a precise topographic map», *Cell*, núm. 93, p. 47-60.

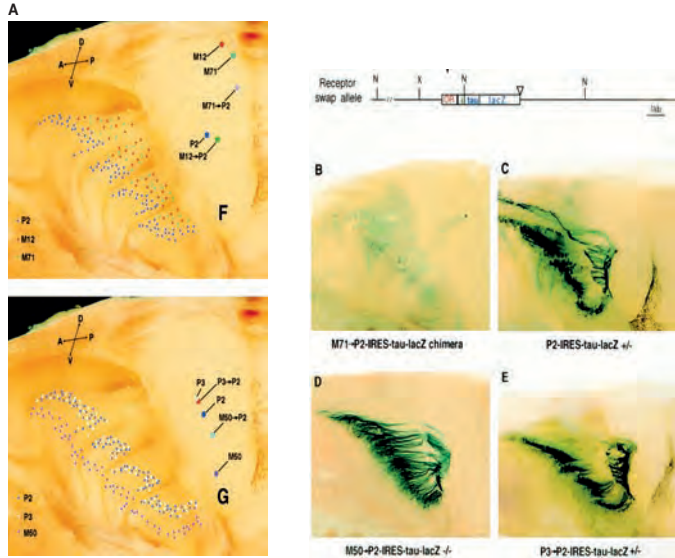


FIGURA 36. La substitució del receptor P2 per un altre OR altera el glomèrul de convergència axònica: a) esquema del locus P2 substituït per les regions codificadores d'altres OR; b) substitució de P2 per M71; els axons convergeixen en un glomèrul en posició més dorsal que el de P2, que es mostra en C; c) P2 sense substituir; d) substitució de P2 per M50; els axons convergeixen en un glomèrul més ventral; e) substitució de P2 per P3; el glomèrul de convergència es localitza en una posició una mica més dorsal que el de P2; f, g) resum esquemàtic dels experiments de substitució. De Wang *et al.* (1998), *Cell*, núm. 93, p. 47-60.

única com l'olor d'èter etílic i no com la suma de potser trenta o quaranta estímuls odorífers diferents. En aquest sentit, el grup de Linda Buck ha dut a terme estudis adreçats a desentranyar com funciona la família de receptors olfatoris a fi de codificar la identitat de les diferents aromes. Un treball molt recent va emprar una aproximació combinant el mesurament de la concentració de calci en les neurones receptores amb la RT-PCR per a identificar OR expressats en l'epiteli olfatori

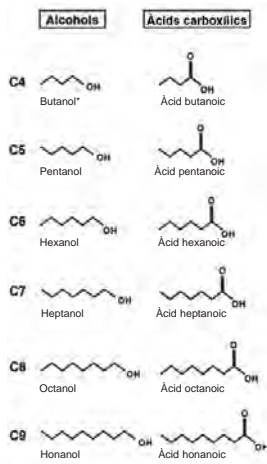


FIGURA 37. Estructures químiques d'alcohols i àcids carboxílics d'entre 4 i 9 àtoms de carboni.

que responen a determinats odorífers.⁸⁶ En aquests experiments es van extreure neurones individuals de l'epiteli nasal de ratolins, que es van carregar amb l'indicador fluorescent Fura-2, sensible a variacions en la concentració de calci lliure, i es van estimular amb un seguit d'odorífers compost per alcohols i àcids carboxílics d'entre quatre i nou carbonis (fig. 37). Posteriorment, mitjançant RT-PCR, es va clonar l'OR que s'expressava en aquelles cèl·lules individuals que responien amb canvis en la concentració de calci a concentracions micromolars d'almenys un dels odorífers de la sèrie. Aquesta

estratègia va permetre d'identificar catorze receptors, molt diversos des del punt de vista de la seqüència, ja que el seu grau d'identitat variava entre el 19 % i el 95 %, i evidentment, es van identificar receptors que responen a un, dos, tres o més dels odorífers (fig. 38).

Atès que existeixen prop de mil OR en el genoma,⁸⁷ aquest codi combinatori de reconeixement d'olors per receptors permet de discriminar una enorme quantitat d'estímuls. Encara que cada odorífer fos codificat per una sola combinació de tres OR, el nombre d'estímuls distints que es podrien discriminar estaria a la vora del miler de milions. Experi-

86. B. MALNIC, J. HIRONO, T. SATO i L. B. BUCK (1999), «Combinatorial receptor codes for odors», *Cell*, núm. 96, p. 713-723.

87. En aquesta estimació no es té en compte el percentatge de pseudogens en humans.

	S1	S3	S6	S18	S19	S25	S41	S46	S50	S51	S79	S83	S85	S86	
Àcid hexanoic															de ranci, de suat, àcid, com de cabra, greixós
Hexanol															dolç, herbal, de fusta, de cognac, de whisky
Àcid heptanoic															de ranci, de suat, àcid, greixós
Heptanol															de violeta, dolç, de fusta, herbal, fresc, greixós
Àcid octanoic															de ranci, àcid, repulsiu, de suat, greixós
Octanol															dolç, de taronja, de rosa, greixós, fresc, potent, de cera
Àcid nonanoic															de cera, de formatge, de fruita seca, greixós
Nonanol															fresc, de rosa, d'olis florals, d'oli de citronella, greixós

FIGURA 38. Comparació dels codis combinatoris de reconeixement de molècules odoríferes pels receptors olfactoris S1-S86. Àcids i alcohols alifàtics (columna esquerra), d'estructura química similar però molt distinta percepció subjectiva (columna dreta), són reconeguts per diferents combinacions de receptors. De B. Malnic *et al.* (1999), *Cell*, núm. 96, p. 713-723.

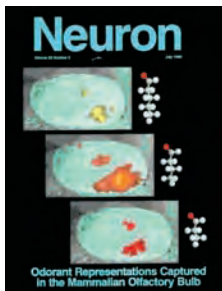


FIGURA 39. L'estimulació olfactiva amb aldehids de 5, 4 o 3 carbonis induïx l'activació de diferents combinacions de glomèruls en el bulb olfactiv de rata. De B. D. Rubin i L. C. Katz (1999), *Neuron*, núm. 23, p. 499-511.

ments de monitorització *in vivo* de l'activitat del bulb olfactiv de rates, que permeten de visualitzar l'activació de glomèruls individuals, confirmen que aquest mecanisme de codificació combinatoria d'olors per part dels receptors es manté en el bulb com un mapa topogràfic de diferents combinacions de glomèruls (fig. 39).⁸⁸

88. B. D. RUBIN i L. C. KATZ (1999), «Optical imaging of odorant representations in the mammalian olfactory bulb», *Neuron*, núm. 23, p. 499-511.

Encara no es coneix com els senyals procedents dels OR de l'epiteli olfatori, que es codifiquen en un mapa d'activació de glomèruls en el bulb, s'organitzen més enllà d'aquesta àrea cerebral per generar la percepció subjectiva d'una aroma. L'experiència mostra, i els perfumistes ho saben prou bé, que el sentit de l'olfacte posseeix un poder evocador que no tenen ni la vista ni l'oïda. Així, l'experiència prèvia és determinant en molts casos a l'hora de percebre una aroma com a diferent, agradable o repulsiva. De fet, fa temps que es va demostrar mitjançant registres electrofisiològics de l'activitat del bulb olfatori que la configuració topogràfica de les àrees activades no solament depèn de la identitat d'un determinat estímul, sinó també de l'experiència.⁸⁹

L'enorme avenç que ha tingut lloc en els darrers quinze anys, gràcies entre altres als premis enguany en Medicina o Fisiologia per la Fundació Nobel (fig. 40), permet d'apreciar la complexitat de la percepció sensorial olfactiva, que en moltes espècies és tan reveladora de l'entorn com ho és la visió en la nostra, i ens ensenya com estem de lluny encara d'explicar una sensació subjectiva en termes moleculars: la mera recepció d'un estímul entrant no constitueix un acte de percepció, sinó que és simplement el primer pas d'un complex trajecte a través del qual el cervell canvia, s'autoorganitza i entra en contacte amb l'entorn per modificar-lo en profit propi.

FIGURA 40. Linda B. Buck i Richard Axel, premis Nobel 2004 en Fisiologia o Medicina «pel seu descobriment dels receptors d'odorífers i l'organització del sistema olfatori».



89. W. J. FREEMAN (1991), «Fisiología de la percepción», *Investigación y Ciencia*, núm. 175, p. 30-38.

