

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Universitätsklinik
Carl Gustav Carus Dresden
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Zahnert

**Elektrophysiologische Messungen bei Stimulation mit HLA-assoziierten
Peptiden an Gesunden**

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
Doctor medicinae (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von

Marie-Elisabeth Krause
aus Mönchengladbach

Dresden 2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
2	Stand der Wissenschaft	5
2.1	Anatomie und Physiologie des Riechens	5
2.2	Das HLA-System	8
2.2.1	Genetik und Vererbung	8
2.2.2	Aufbau und Prozessierung der HLA-Moleküle.....	10
2.2.3	Immunologische Funktion	12
2.2.4	Nomenklatur	13
2.3	Olfaktorische Wahrnehmung von HLA-assoziierten Peptiden und deren Funktion.....	13
2.4	Psychophysische und elektrophysiologische Testverfahren.....	16
2.4.1	Das Elektroolfaktogramm.....	16
2.4.2	Das olfaktorisch ereigniskorrelierte Potential.....	18
2.5	Zielstellung	20
3	Material und Methodik	21
3.1	Auswahl der Testpersonen und Teilnahmekriterien.....	21
3.2	Studienablauf.....	21
3.3	Die Nonapeptide.....	22
3.3.1	Aufbereitung der Nonapeptide	22
3.3.2	Volatilitätstestung der Nonapeptide	22
3.4	Psychophysische Untersuchung	24
3.4.1	Geruchsidentifikationstest	24
3.4.2	Drei-Gläser-Probe	24
3.5	Elektrophysiologische Untersuchung	25
3.5.1	Training der velopharyngealen Atemtechnik	25
3.5.2	EOG- und OEP-Gewinnung.....	25
3.5.3	Messelektrode.....	26
3.5.4	Olfaktometer.....	27
3.5.5	Gasgemische	29
3.5.6	Versuchsablauf	30
3.6	Auswertung.....	30
4	Ergebnisse	33
4.1	Testpersonen und Identifikationstest	33
4.2	Volatilitätstestung	33
4.3	Psychophysische Untersuchung	34
4.4	EOG.....	35
4.4.1	Anzahl der EOGs	35
4.4.2	Amplituden der EOGs	37

4.4.3	Latenzzeiten der EOGs.....	38
4.4.4	Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf Alter und Geschlecht der Testpersonen	39
4.5	CSEP im EEG	39
4.5.1	Anzahl der CSEP-Antworten im EEG	39
4.5.2	Amplituden der CSEPs	40
4.5.3	Latenzzeiten der CSEPs.....	41
4.5.4	Kongruenzen der Antworten in EOG und EEG.....	42
4.6	Frequenzanalyse	43
4.7	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45
5	Diskussion	46
5.1	Bewertung der Ergebnisse der Volatilitätstestung	46
5.2	Diskussion der Testmethoden.....	46
5.2.1	Beurteilung der Ergebnisse der Psychophysischen Untersuchung.....	46
5.2.2	Beurteilung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen und der Frequenzanalyse.....	47
5.3	Diskussion der Ergebnisse in Bezug auf die olfaktorische Wahrnehmung von HLA-assoziierten Peptiden	49
5.4	Schlussfolgerungen.....	51
6	Ausblick.....	52
7	Zusammenfassung.....	53
8	Summary	54
9	Abbildungsverzeichnis	55
10	Abkürzungsverzeichnis	58
11	Tabellenverzeichnis	59
12	Literaturverzeichnis	60
13	Anhang	67
14	Erklärungen.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
14.1	Selbstständigkeitserklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
14.2	Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens ...	Fehler! Textmarke nicht definiert.
14.3	Erklärung zur Einhaltung rechtlicher Vorschriften	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

Attraktivität spielt eine große Rolle in unserer non-verbalen Kommunikation und hat einen hohen Stellenwert in der Suche nach einem möglichen Partner. Dabei kommt es in der Frage, was Attraktivität eigentlich ausmacht, immer wieder zu Kontroversen, denn Attraktivität ist multimodal (Groyecka et al., 2017). Die Beurteilung der „Attraktivität“ basiert dabei auf der Wahrnehmung unserer Sinne. Natürlich steht dabei beim Menschen der visuelle Eindruck an erster Stelle und hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Gesamt-Attraktivität. Es fließen aber auch andere Eindrücke, wie die Stimme und der Geruch einer Person, mit ein. Besonders letzterer erfordert jedoch einen engen physischen Kontakt und der Stellenwert nimmt daher erst im fortgeschrittenen Stadium der sozialen Interaktion an Bedeutung zu.

Der Geruchssinn ist anatomisch unser ältester Sinn, da die Verarbeitung von Riechvorgängen im ältesten Teil des Gehirns, dem Paläocortex, stattfindet, und hat daher evolutionsbiologisch eine besondere Stellung. Die Informationen von Geruchseindrücken werden ohne Zwischenschaltstation direkt an das Gehirn weitergegeben.

Ein Duftstoff besteht aus verschiedenen Molekülanteilen, die wiederum an verschiedene Rezeptoren binden können. Duftstoffe aktivieren also ein Muster von olfaktorischen Rezeptorneuronen (Witt und Hansen, 2008). Das Gehirn lernt diese duftspezifischen Muster zu erkennen und einzuordnen. Es gibt 200-400 mögliche Gene für olfaktorische Rezeptorneurone, von denen jeder Mensch verschiedene exprimiert (Buck und Axel, 1991). Man kann also vereinfacht sagen, dass jeder Mensch Gerüche individuell wahrnimmt.

Was aber macht den Geruch einer Person attraktiv?

Jeder Mensch synthetisiert sein eigenes „Parfum“, den Körpergeruch. Er wird maßgeblich vom Schweiß bestimmt, der von den Schweißdrüsen sezerniert wird, die sich insbesondere auf behaarter Haut wie in der Achselregion und auch im Intimbereich finden. In dem Schweiß finden sich hauptsächlich Wasser, Elektrolyte und Fettsäuren. Jedoch befinden sich im Schweiß auch abgestorbenes Zellmaterial von der Haut, sowie auch kleine Moleküle von abgebautem Zellmaterial aus dem Körper selbst. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob auch sogenannte HLA-assoziierte Peptide einen Einfluss auf den Körpergeruch haben, beziehungsweise vom Menschen gerochen werden können und gegebenenfalls als Attraktivitätsmerkmal infrage kämen.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Anatomie und Physiologie des Riechens

Um ein Duftmolekül riechen zu können, muss es mit einem Luftstrom durch eine Nasenöffnung entweder orthonasal, über die vorderen Nasenlöcher, oder retronasal, über den Mund und Rachen, in die Nasenhöhle gelangen und im olfaktorischen Epithel Rezeptorneuronen aktivieren. Die gesamte Nasenhöhle ist mit Schleimhaut ausgekleidet, die sensibel von dem Nervus trigeminus, dem fünften Hirnnerven, innerviert wird. Die Regio olfactoria, der Teil der Schleimhaut auf der sich das olfaktorische Epithel befindetet, reicht von der Riechspalte im Nasendach über den oberen Nasengang bis auf die mittlere Nasenmuschel (siehe Abbildung 1) (Leopold et al., 2000). Dem olfaktorischen Epithel lagert eine Schicht aus Schleim auf, der von Bowmann-Drüsen sezerniert wird, die in der Lamina propria liegen. Neben der Funktion als Schutz- und Immunbarriere des Schleimfilms tragen sich in dem Mukus befindliche duftstoffbindende Proteine möglicherweise zur Interaktion von Duftstoffen mit den Rezeptoren der ORN bei (Pelosi, 2001). Das Riechepithel selbst setzt sich aus olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN), den Riechsinneszellen, Stützzellen und Basalzellen zusammen (siehe Abbildung 2).

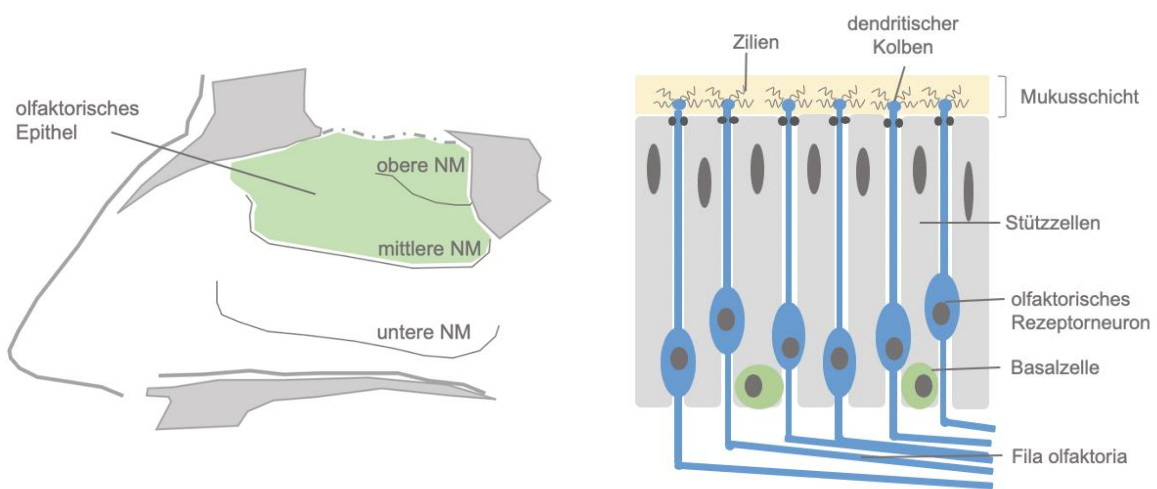


Abbildung 1: Verteilung des olfaktorischen Epithels (grün) von der Riechspalte bis auf die obere und mittlere Nasenmuschel (NM), (modifiziert nach Lapid (Sinneszellen), Basalzellen und Stützzellen (modifiziert und Hummel, 2013 adaptiert von Leopold et al., 2000) nach Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012)

Die Stützzellen trennen die einzelnen ORN voneinander und geben dem Epithel durch Tight Junctions Stabilität (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012). Die Basalzellen dienen als Vorläuferzellen für die Stützzellen und ORN (Graziadei und Metcalf, 1971). ORN sind bipolare Nervenzellen mit zwei Fortsätzen, dem Dendriten und dem Axon, deren eigentlichen Zellkörper in der mittleren Schicht des Epithels liegen. Die dendritischen Fortsätze reichen bis in die Mukusschicht und an deren Ende befindet sich der dendritische Kolben mit den Zilien,

in deren Zellmembranen die eigentlichen Rezeptorproteine eingelagert sind. Jeder Rezeptor wird von einem Gen codiert, das aus einer großen Genfamilie stammt (Buck und Axel, 1991) und von denen der Mensch geschätzt 200-400 hat (Witt und Hansen, 2008). In der Zellmembran eines jeden ORN ist nur einer dieser Rezeptortypen zu finden. Ein Duftmolekül kann durch verschiedene Molekülanteile immer mehrere Rezeptoren aktivieren.

Wird ein Duftstoffligand von einem Rezeptorprotein gebunden, kommt es zu einer spezifisch olfaktorischen G_{olf} -Protein-gekoppelten Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Dabei werden über den second Messenger zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) olfaktorische Kationenkanäle geöffnet, durch die Na^+ und Ca^{2+} Ionen einströmen (Firestein et al., 1991). Durch das einströmende Ca^{2+} wird ein Anionenkanal geöffnet, durch den Cl^- -Ionen aus der Zelle ausströmen (siehe Abbildung 3). Das Membranpotential wird somit positiver und folgend wird ein Aktionspotential ausgelöst (Firestein, 2001), das elektrophysiologisch gemessen werden kann (siehe hierzu 2.4.1).

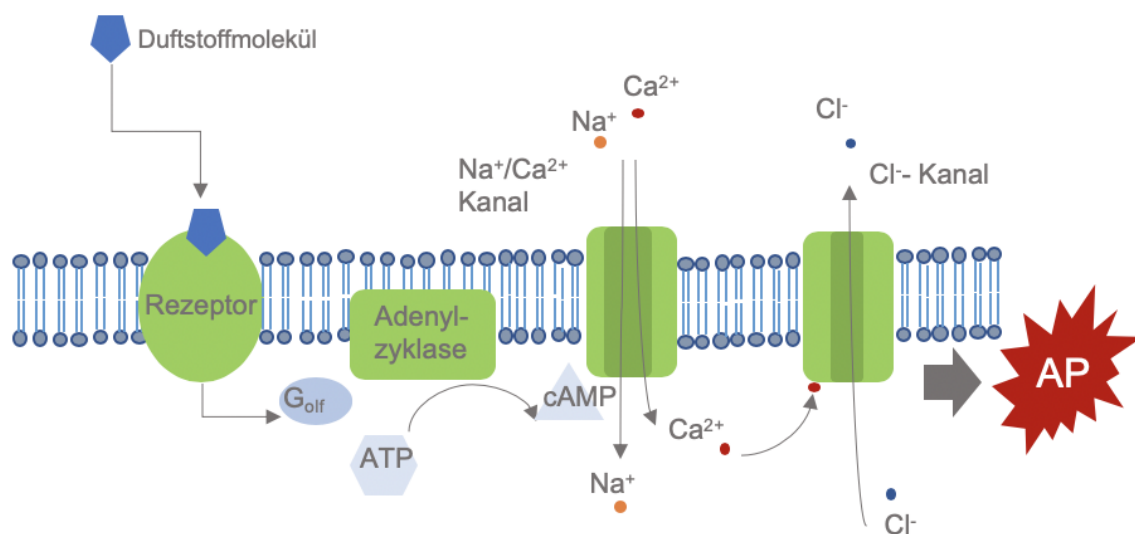


Abbildung 3: schematischer Ablauf der Vorgänge in einem ORN bei Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Signalkaskade durch Bindung eines Duftstoffmoleküls an ein Rezeptorprotein. (AP=Aktionspotential, ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = zyklisch Adenosinmonophosphat, G_{olf} = olfaktorisches G-Protein) (modifiziert nach Witt und Hansen, 2008).

Die Axone der ORN ziehen gebündelt als Fila olfactoria durch die Siebbeinplatte und enden als Nervus olfactorius, dem 1. Hirnnerv, im paarig angelegten Bulbus olfactorius (Hatt, 2006), der eine direkte Ausstülpung des Gehirnes ist. Aufgrund der Tatsache, dass die Axone der ORN im Bulbus olfactorius einen direkten Zugang zum Gehirn haben, werden die ORN als primäre Sinneszellen bezeichnet. Die ORN haben für Nervenzellen die Besonderheit, dass sie sich zeitlebens regenerieren können (Graziadei und Monti Graziadei, 1983) und ständig wieder neu in den Bulbus olfactorius einwandern (Curtis et al., 2007). Die Axone der ORN bilden in

glomerulären Einheiten synaptische Verbindungen mit den Mitralzellen des Bulbus olfactorius. Dabei werden alle Axone derer ORN, die die gleichen Rezeptorproteine ausgebildet haben, in einem Glomerulum zusammengeführt; dies wird als Konvergenz bezeichnet (Müller et al., 2005). Die Mitralzellen werden durch hemmende Zellen, die Körnerzellen und Interneurone, beeinflusst, was zur Kontrastierung des Riecheindrucks beiträgt (Witt und Hansen, 2008). Die Axone der Mitralzellen folgen dem Tractus olfactorius und projizieren in den „olfaktorischen Kortex“, die übergeordneten sekundären olfaktorischen Strukturen, und werden dann in die Zentren der tertiären olfaktorischen Strukturen, zu denen die Insel und der orbitofrontale Kortex gehören, weitergeleitet (siehe Abbildung 4). Zu den sekundären Strukturen gehören der Nucleus olfactorius anterior (AON), der posterior zum Bulbus olfactorius liegt, der piriforme Kortex in der Übergangsregion vom Frontal- in den Temporallappen, die Amygdala unterhalb des piriformen Kortex und der entorhinale Kortex des medialen Temporallappens. Durch die enge räumliche Beziehung von Amygdala, die bei emotionalen Bewertungsvorgängen beteiligt ist, und dem Hippocampus, der bei Gedächtnisvorgängen eine wichtige Rolle spielt, kann erklärt werden, dass die Wahrnehmung von Düften eng mit Erinnerungen verknüpft ist. Die wichtigsten weiterführenden Bahnen laufen dann vom AON über die vordere Kommissur zum kontralateralen Bulbus, sowie vom piriformen Cortex zum orbitofrontalen Cortex und zur Insel. Die kreuzenden Bahnen zum kontralateralen Bulbus wirken wiederum inhibitorisch zur Kontrastierung der Gerüche. Die Inselrinde des Neokortex gilt als Integrationszentrum von olfaktorischen und anderen Sinnes-Modalitäten wie dem Schmecken (Witt und Hansen, 2008). Der orbitofrontale Kortex, in den auch andere sekundäre Strukturen wie die Amygdala und der entorhinale Kortex hineinprojizieren, hat eine Rolle beim Arbeitsgedächtnis, der Erkennung von Düften und Belohnungsvorgängen (Rolls, 2004).

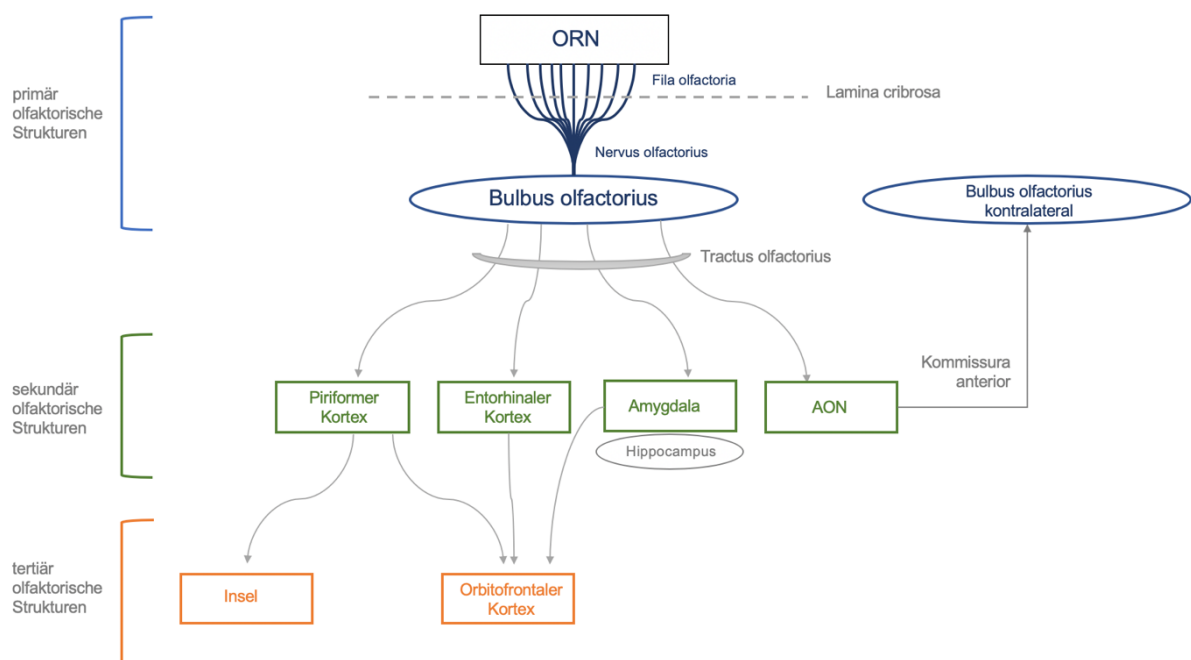


Abbildung 4: schematische Darstellung der Riechbahnen

2.2 Das HLA-System

Das HLA-System (Humanes Leukozytenantigen-System) ist ein Teil des adaptiven Immunsystems beim Menschen und beschreibt Zellproteine in der Zellmembran, die mit Peptidfragmenten beladen sind und diese an der Zelloberfläche präsentieren. Sie haben eine zentrale Rolle bei der Erkennung von körpereigenem und -fremdem Material, der resultierenden immunologischen Antwort und der Bildung des immunologischen Gedächtnisses. Diese Zellproteine befinden sich insbesondere auf den Leukozyten, wovon ihr Name „Humanes Leukozytenantigen“ abgeleitet wurde. HLA-Rezeptoren sind das humane Pendant zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC-Komplex), der auf Zellen aller Wirbeltiere gefunden werden kann (Murphy und Weaver, 2018).

Das HLA-System wurde erstmals im Zusammenhang mit Organabstoßungsreaktionen beschrieben (Dausset, 1958) und seitdem intensiv erforscht. Es gibt verschiedene HLA-Moleküle, deren Gene im humanem Genom einen hohen Polymorphismus zeigen, sodass es viele individuell unterschiedlich verteilte Variationen in der menschlichen Population gibt (Klein et al., 1993).

2.2.1 Genetik und Vererbung

Die für das HLA-System codierenden Gene liegen auf dem kurzen Arm des 6. Chromosoms auf der Bande 6p21. Wie in der ersten Sequenzierung beschrieben, umfasst diese Region klassischerweise 244 Gen Loci auf einer Länge von 3.6 Megabasenpaaren (The MHC sequencing consortium, 1999). Als man das gesamte Chromosom 6 sequenzierte, fanden sich noch weitere Gene in der Nähe, die einen Bezug zu dem HLA-System hatten, sodass nun vom „extended HLA“ (oder xHLA) mit einem Umfang von 7.6 Megabasenpaare gesprochen wurde (Mungall et al., 2003; Horton et al., 2004).

Die klassischen HLA-Regionen (siehe Abbildung 5) sind in drei Klassen gegliedert, vom Zentromer ausgehend HLA-Klasse-II-, -III-, und I-Loci. Die HLA-Klasse-I-Regionen (sogenannte HLA-A, HLA-B, HLA-C) beinhalten die Codierung für die alpha-Polypeptidkette der HLA-Klasse-I-Zellproteine (zum Aufbau der Zellproteine siehe 2.2.2). Die HLA-Klasse-II-Regionen (sogenannte HLA-D-) codieren für die alpha- und beta-Ketten der HLA-Klasse-II-Zellproteine. In der HLA-Klasse-III-Region findet sich eine heterogene Gruppe an Genen, die unter anderem für Regulatoren des Komplementsystems, Tumornekrosefaktoren und Hitzeschockproteine codieren (Klein und Sato, 2000; Fischer und Mayr, 2011). Auf dem gleichen Abschnitt des Chromosoms 6 liegen weiterhin Gene, deren Produkte ebenfalls Funktionen im Immunsystem erfüllen. Außerdem ist bemerkenswert, dass im xHLA, also direkt an die klassischen HLA-Regionen angrenzend, Gene für olfaktorische sowie vomeronasale

Rezeptoren liegen (Horton et al., 2004). Letztere scheinen jedoch beim Menschen ihre Funktion verloren zu haben (Giorgi, 2000).

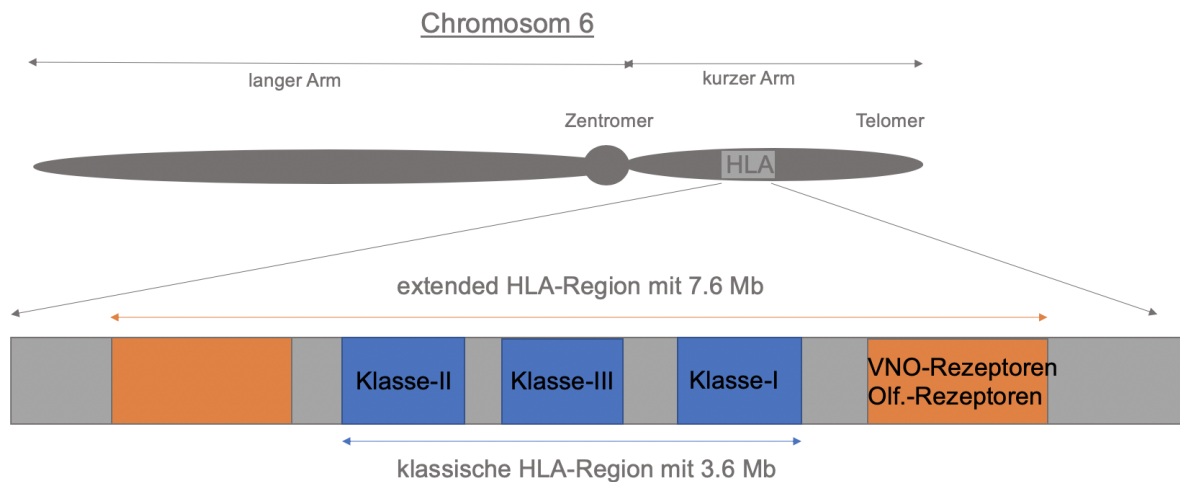


Abbildung 5: schematische Darstellung des Chromosom 6 mit kurzem Arm, auf dem die genetisch codierenden Regionen für die HLA-Proteine liegen. In der klassischen HLA-Region (dunkelblau) finden sich von Zentromer nach Telomer gelegen die Klasse-II-Region, gefolgt von der Klasse-III und Klasse-I. In der extended HLA-Region (orange) finden sich weitere mit dem HLA-System in Bezug stehende Genregionen, die unter anderem auch für olfaktorische Rezeptoren (Olf.) und Rezeptoren des vomeronasalen Organes (VNO)(modifiziert nach Fischer und Mayr, 2011).

Die verschiedenen Allele auf dem Chromosom 6 werden kodominant exprimiert, man kann also unterschiedliche HLA-Moleküle der gleichen Klasse auf einer Zelle finden. Die Allele auf Chromosom 6 werden als Gesamtheit, dem sogenannten Haplotyp, vererbt. Da der Haplotyp zumeist heterozygot vorliegt, da jeder Mensch zweimal das Chromosom 6 hat, erbt jedes Individuum eine von vier Kombinationsmöglichkeiten des väterlichen und mütterlichen Haplotypen. Diese beiden Haplotypen zusammen ergeben den Genotypus. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Geschwister denselben HLA-Genotyp haben ist demnach auch eins zu vier.

Durch die hohe Variabilität der Genloci, den Polymorphismus und die Vielfalt der Gene für HLA-Klasse-I und -II-Molekülen, die Polygenie, gibt es in der Gesamtpopulation viele Variationsmöglichkeiten des HLA-Typus (Murphy und Weaver, 2018). Dieser Polymorphismus findet sich insbesondere für die Gen-Loci der peptidbindenden Regionen (PBR) der HLA-Moleküle (Klein und Sato, 2000) und er ist für die menschliche Spezies evolutionär entscheidend, um sich an die Vielzahl der Viren, Bakterien und Parasiten anzupassen, die regional verschieden vorkommen. Deshalb ist der Genpool der HLA-Gene durch Selektion und Mutation regional und bevölkerungsspezifisch unterschiedlich (Fischer und Mayr, 2011).

2.2.2 Aufbau und Prozessierung der HLA-Moleküle

Die HLA-Moleküle lassen sich in zwei Klasse aufteilen. Beide bestehen aus jeweils zwei Polypeptidketten, die ein Heterodimer bilden, das mit dem transmembranösen Domänenanteil in der Zellmembran verankert sind. Die schwere sogenannte α -Kette (44 kD) des HLA-I-Moleküls besteht aus 5 Domänen, den extrazellulären Anteilen α_1 - α_3 , von denen α_1 und α_2 die PBR bilden, einem transmembranösen Anteil und einem zytoplasmatischen Schwanzbereich. Ihr lagert sich das β_2 -Mikroglobulin, die sogenannte leichte Kette (12 kD), die ein nicht polymorphes Polypeptid ist und dessen genetische Information auf Chromosom 15 (Bande 15q4) und nicht auf Chromosom 6 liegt, mit einer Domäne an. HLA-Klasse-II-Moleküle bestehen aus zwei Polypeptidketten, der α - und β -Kette, mit jeweils 4 Domänen, analog zum HLA-I-Molekül mit jeweils zwei extrazellulären Bereichen (α_{1-2} und β_{1-2}), einem transmembranösen Bereich und einen zytoplasmatischen Schwanzbereich. Die PBR wird beim Klasse-II-Molekül von den Domänen α_1 und β_1 gemeinsam gebildet (Klein und Sato, 2000).

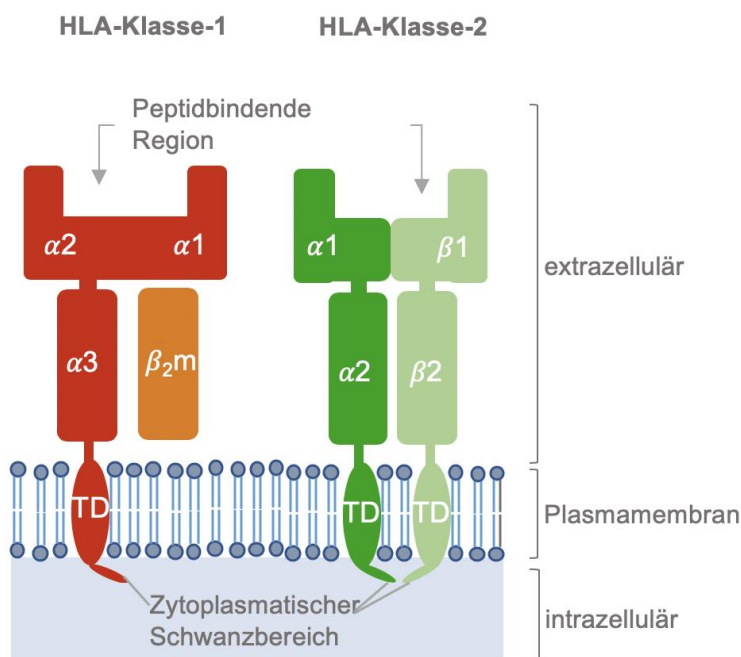


Abbildung 6: Struktur von HLA-Klasse-I und -II-Molekülen. Sie ragen mit einem zytoplasmatischen Schwanzbereich in das Zytosol und sind durch transmembranöse Domänen (TD) in der Zellmembran verankert. Der extrazelluläre Domänenbereich besteht bei dem Klasse-I-Molekül aus den 3 Teilen der α -Kette, die mit ihren Domänen α_1 und α_2 die PBR bildet, und dem β_2 -Mikroglobulin. Analog dazu wird der extrazelluläre Domänenbereich der Klasse-II-Moleküle von zwei Teilen der α - und β -Kette gebildet. Die PBR wird hier von der α_1 und β_1 -Domäne bestimmt. (modifiziert nach Klein und Sato, 2000)

Die HLA-Klasse-I-Moleküle sind auf den meisten Zellen im menschlichen Körper zu finden, wohingegen Klasse-II-Moleküle nur auf antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems, den B-Lymphozyten, aktivierten T-Zellen, dendritischen Zellen, den Monozyten, sowie auf manchen Endothelzellen vorkommen. Die HLA-Moleküle binden in ihrer PBR intrazellulär Peptide, die sie dann auf der Zelloberfläche exprimieren. Durch ihre dreidimensionale Struktur,

die von α -Helices und β -Faltblattstrukturen bestimmt wird, haben sie jeweils spezielle Bindungseigenschaften. Beide Klassen können nur Peptide binden, die genau in ihre PBR passen (Falk et al., 1991). Klasse-I-Moleküle präsentieren mit ihrer PBR nur Peptidfragmente mit einer Länge von 8-11 Aminosäuren, die zwei spezifische Ankerpositionen an der zweiten und neunten Position haben, durch die verschiedene HLA-Typen definiert werden können. Die PBR der Klasse-II-Moleküle ist jedoch anders beschaffen und die Seiten liegen offen, sodass auch längere Peptide mit bis zu 30 Aminosäuren gebunden werden können. Sie haben ebenfalls Ankerpositionen, die jedoch nicht so spezifisch sind, wie die der Klasse-I-Moleküle (Rammensee et al., 1995).

Die beiden HLA-Moleküle unterscheiden sich grundlegend in der Lokalisation und der Art der Peptidbeladung. Die Peptide, mit denen Klasse-I Moleküle beladen werden, stammen von intrazellulären Proteinen, die von Proteasomen abgebaut wurden und sich am Synthesort der HLA-Moleküle, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), an die PBR anlagern. Dann werden sie über Lysosomen, die vom Golgi-Apparat abgeschnürt werden, in die Zellmembran eingebaut. Die Proteine, mit denen der Klasse-II-Moleküle später beladen werden, werden zuerst durch Endozytose von extrazellulärem Material in einem Endosom aufgenommen. Nachdem das Klasse-II-Molekül, im ER synthetisiert wird und mit einer invarianten Kette beladen wurde, gelangt es durch den Golgi-Apparat in ein Lysosom. Das Lysosom verschmilzt dann mit dem Endosom zum Klasse-II-Kompartiment. Dort wird das extrazelluläre Material zu Peptidfragmenten zerkleinert und die invariante Kette auf dem Klasse-II-Molekül gegen ein Peptid ausgetauscht. Zuletzt wird das beladene Klasse-II-Molekül im Klasse-II-Kompartiment zur Zellmembran transportiert (siehe Abbildung 7). Die Peptidfragmente der Klasse-I-Moleküle stammen also von intrazellulär abgebautem viralem Material oder auch intrazellulären Bakterien, während die Klasse-II-Moleküle mit extrazellulärem Material wie Zellfragmenten von extrazellulären Bakterien, Parasiten oder eigenem Zellmaterial beladen werden (Klein und Sato, 2000; Murphy und Weaver, 2018).

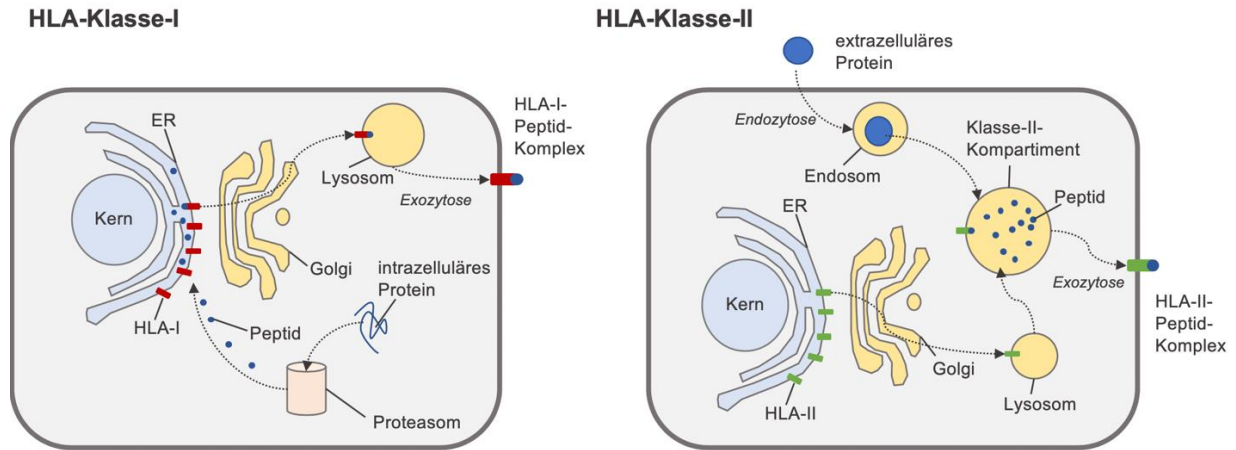


Abbildung 7: intrazelluläre Synthesewege der HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Peptidkomplexe (modifiziert nach Klein und Sato, 2000)

2.2.3 Immunologische Funktion

Die Immunologische Funktion der HLA-Moleküle besteht darin, die gebundenen Peptidfragmente an die T-Zellen des Immunsystems zu präsentieren, damit diese bei Erkennung eine Immunantwort hervorrufen können. Klasse-I-Moleküle interagieren hierbei mit den T-Zell-Rezeptoren von CD8⁺ T-Zellen, wohingegen Klasse-II-Moleküle von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden. CD8⁺-Zellen werden auch als zytotoxische T-Zellen oder natürliche Killerzelle bezeichnet. Ihre Funktion ist es, nach Erkennen eines Antigens auf einem HLA-Molekül, die Zelle dem Zelltod zuzuführen. Wird eine Zelle von einem Virus oder einem intrazellulären Bakterium befallen, ist der Zelltod über die Killerzelle der Weg zur Heilung von der Infektion. CD4⁺ Zellen, sogenannte T-Helferzellen, erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor Peptide der HLA-Klasse-II-Moleküle, die von Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert werden. Erkennt eine T-Helferzelle das Antigen, kann sie unter anderem eine B-Zelle aktivieren. Diese B-Zelle proliferiert und differenziert sich weiter in Antikörperproduzierende Plasmazellen und Gedächtniszellen, die bei der humoralen Immunantwort eine große Rolle spielen (Murphy und Weaver, 2018).

Bei der Reifung und Selektion von B-Zellen im lymphatischen System und T-Zellen im Thymus wird die Erkennung von körpereigenen Peptiden auf den HLA-Rezeptoren getestet. Zellen, die auf körpereigene Antigene reagieren, werden entfernt, damit es zu keiner Autoimmunreaktion kommt. Es lässt sich jedoch eine Häufigkeit bestimmter HLA-Typen mit Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (HLA-DR3) oder der Spondylitis ankylosans (HLA-B27) beobachten. Eine Verbindung vom HLA-Genotyp mit Autoimmunerkrankungen erscheint durch die entscheidende Rolle der HLA-Moleküle im Immunsystem und bei der Erkennung von körpereigenen und fremden Peptiden nachvollziehbar.

2.2.4 Nomenklatur

Die Nomenklatur der molekularbiologisch nachweisbaren Allele wird von dem HLA-Nomenklaturkomitee der Weltgesundheitsorganisation vorgegeben. Zunächst wird mit dem HLA-Präfix begonnen gefolgt von dem Buchstaben, der für den jeweiligen HLA-Locus steht. Nach einem „*“ als Separator werden mit bis zu vier Zifferngruppen die einzelnen Allele beschrieben, jeweils durch ein „:“ getrennt. Die erste Zifferngruppe beschreibt die serologische Allelenhauptgruppe, gefolgt von einer Zahlenfolge für unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Dann werden mit zwei Ziffern Allelen unterschieden, die zwar die gleiche Aminosäuresequenz haben, bei denen jedoch stumme Mutationen die Nukleotidabfolge verändert haben. Die letzte Zifferngruppe steht für Veränderung nicht codierender Bereiche. Der Großbuchstabe am Ende steht für das Expressionsverhalten (N=nicht exprimiert, L=schwach exprimiert, S=löslich im Plasma, A=aberrant, C=zytoplasmatisch).

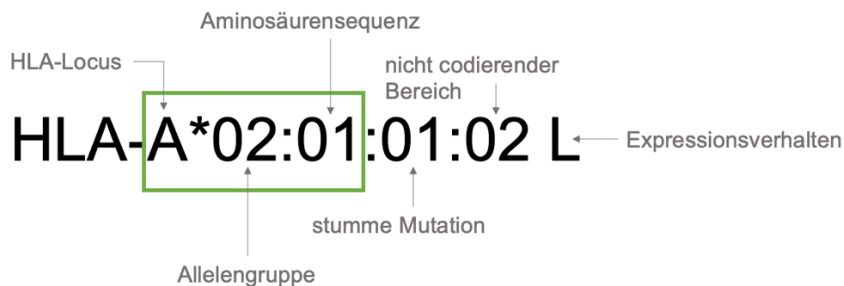


Abbildung 8: Beispiel zur Nomenklatur eines HLA-Klasse-I-Allels, in grün unterlegt die für die Klinik und auch für diese Arbeit relevante Form.

Für klinische Zusammenhänge und auch für diese Arbeit ist es jedoch nur wichtig, die HLA-Allele anhand der PBR zu unterscheiden, wodurch die letzten beiden Zifferngruppen wegfallen würden, da diese nur genetische Variationen ohne Einfluss auf die Aminosäuresequenzfolge der PBR darstellen (siehe grüne Markierung in Abbildung 8). Dies würde dann durch den Großbuchstaben P am Ende verdeutlicht. Wäre bei der PBR nicht nur die Aminosäuresequenz, sondern auch die Nukleotidsequenz identisch, würde man dies mit einem G am Ende darstellen.

2.3 Olfaktorische Wahrnehmung von HLA-assoziierten Peptiden und deren Funktion

Säugetiere präferieren bei der Partnerwahl Individuen, deren MHC-Merkmale zu ihren eigenen disassortativ, unähnlich, sind. Dies wurde erstmals von Yamazaki an Mäusen nachgewiesen (Yamazaki et al., 1976) und Wedekind und Kollegen konnten dieses Phänomen 1995 erstmals auch für den Menschen zeigen (Wedekind et al., 1995). Es stellte sich die grundlegende Frage, wie der HLA-Typ des Gegenübers identifiziert werden konnte und welche Funktion diese disassortative Präferenz hat.

Viele Studien implizierten, dass MHC-Gene einen Einfluss auf den Geruch des einzelnen Individuums haben (Yamazaki et al., 1999). Dabei wurden viele Theorien über die Art und Weise des Einflusses diskutiert. Darunter auch, ob MHC-Gene das Mikrobiom der Haut beeinflussen und ob Fragmente der MHC-bindenden Peptide Quelle volatiler Duftstoffe sind (Penn und Potts, 1999). Diese Peptide waren in Körperflüssigkeiten bei Mäusen, wie dem Speichel, Urin und Schweiß gefunden worden (Singh et al., 1987) und konnten auch in menschlichen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (Wobst et al., 1998). Durch den proteolytischen Abbau der MHC-Moleküle werden die Peptide frei, können ins Blut und andere Körperflüssigkeiten gelangen und dann an andere Rezeptoren, wie die ORN, binden (siehe Abbildung 9) (Boehm und Zufall, 2006). Die Peptide spiegeln mit ihrer Ankerstruktur genau die PBR des MHC-Rezeptors wider und können somit indirekt Informationen über die Beschaffung des individuellen Immunsystems und Widerstandsfähigkeit geben.

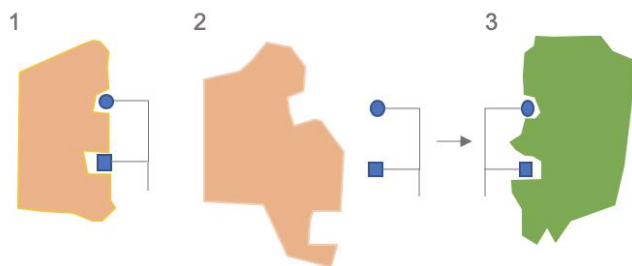


Abbildung 9: Konversion eines MHC-gebundenen Peptides zu einem olfaktorisch wahrnehmbaren Molekül; (1) die PBR eines MHC-Moleküls ist mit einem Peptid mit variabler Länge, aber definierter Anker-Struktur besetzt. (2) das MHC Molekül wird proteolytisch abgebaut, was die PBR strukturell ändert und das Peptid freisetzt. (3) das Peptid kann an andere Rezeptoren wie die ORN binden (modifiziert nach Boehm und Zufall, 2006)

Im vomeronasalen Organ (VNO) von Mäusen wurden spezifische Rezeptoren gefunden, die auf MHC-Klasse-I Peptide reagierten (Leinders-Zufall et al., 2004). Das vomeronasale Organ ist ein zusätzliches Riechorgan von Säugetieren, in dem auch spezifische Rezeptoren für Pheromone liegen (Leinders-Zufall et al., 2000). Es besteht aus dem mit Rezeptorzellen ausgekleideten Ductus vomeronasalis, deren Axone sich zum Nervus vomeronasalis vereinen und zum akzessorischen Bulbus olfactorius ziehen (Knecht et al., 2003). Beim Menschen gibt es eine embryologische Anlage, deren typische Strukturen mit funktionellen Rezeptoren in der weiteren Entwicklung verloren gehen und demnach wahrscheinlich nicht funktional sind (Witt und Hummel, 2006). Jedoch stellte sich heraus, dass die MHC-assoziierten Peptide von Ratten auch noch wahrgenommen werden konnten, nachdem man das VNO entfernt hatte (Spehr, 2006). Das sprach dafür, dass es ebenfalls Rezeptoren für MHC-assoziierte Peptide im olfaktorischen Epithel mit regulären ORN geben musste. Bemerkenswert ist ebenfalls, dass ORN auch auf menschliche Spermien gefunden werden können (Spehr et al., 2004). Es gibt

eine enge genetische Verlinkung der ORN auf Spermien mit den HLA-Genorten, die die Prägung der ORN auf HLA-Moleküle vermuten lässt (Ziegler et al., 2002).

Eine HLA basierte Partnerwahl könnte mindestens zwei entscheidende Vorteile für die evolutionsbiologische Anpassung leisten: zum einen würde potentiell die Anfälligkeit der Nachfahren gegenüber infektiösen Krankheiten vermindert und zum anderen kann Inzucht vermieden werden (Penn, 2002). Zum einen wird angenommen, dass, wenn die HLA-Allele heterozygot vorliegen, die Widerstandsfähigkeit gegen infektiöse Keime höher ist. Demnach müsste das Ziel der Partnerwahl sein, eine möglichst große HLA-Diversität für die Nachkommen zu erreichen. Jedoch ergibt sich das Paradox, dass der Polymorphismus der HLA-Gene auf Populationsebene nicht zu großen intra-individuellen Unterschieden der HLA Diversität führt. Anscheinend gibt es ein Diversitätsoptimum, das durch eine erhöhte Wahrscheinlichkeit für Autoimmunkrankheiten bei zu großer Diversität erklärt werden kann (Woelfing et al., 2009). Zum anderen wird vermutet, dass es durch die disassortative HLA-Präferenz nicht zu einer Paarung mit genetisch Verwandten, wie Geschwistern und Eltern, kommt, beziehungsweise, dass genetische Verwandte durch ihren HLA-Typ erkannt werden können und dann die Paarung vermieden wird (Penn, 2002). Das würde wiederum das Risiko von genetisch vererbten Krankheiten verringern.

Nach der Studie von Wedekind wurden weitere Arbeiten mit gemischten Ergebnissen publiziert. Milinski zeigte, dass Studienteilnehmende mit übereinstimmendem HLA-Typ Parfums mit gleichen Düften für sich selbst aussuchten (Milinski, 2001). Eine Studie von Carvalho Santos aus dem Jahr 2005 konnte keine Präferenz für den Geruch des anderen Geschlechtes mit unterschiedlichem HLA-Typ-I bei 58 Studienteilnehmern finden (Carvalho Santos et al., 2005). In einer jüngeren Studie von 2013 veröffentlichten Milinski und Kollegen fMRT-Daten von Menschen bei olfaktorischer Stimulation mit HLA-Klasse-I assoziierten Peptiden, die implizierten, dass es eine spezifische Aktivierung von Gehirnarealen der typischen olfaktorischen Verarbeitung bei deren olfaktorischen Wahrnehmung gab (Milinski et al., 2013). An dieser Studie wurde im Nachhinein jedoch kritisiert, dass die Peptide als Moleküle zu schwer wären, um volatil zu sein und man nicht gezeigt hätte, wie und ob diese überhaupt an das olfaktorische Epithel gelangen konnten. Es käme nur eine Übertragung in einem Aerosol in Betracht. Außerdem hätte man keine Diskriminationstestung eingeschlossen (Natsch, 2014). In einer großen Befragungsstudie (n=508) aus dem Jahr 2016 von Paaren mit HLA-Typisierung wurde eine Korrelation zwischen HLA-Dissimilarität mit der Zufriedenheit in der Beziehung an sich und mit der Sexualität in der Beziehung, sowie dem Kinderwunsch und mit der Attraktivität des Körpergeruches aufgezeigt (Kromer et al., 2016).

2.4 Psychophysische und elektrophysiologische Testverfahren

Zur Untersuchung des Riechvermögens und des Riechvorganges können sowohl subjektive als auch objektive Testverfahren verwendet werden.

Die psychophysische Testung ist ein subjektives Testverfahren, mit der die Reaktion einer Testperson auf einen Duftreiz beurteilt wird. Zugrunde liegende Prinzipien sind hierbei zum einen die „forced choice“ Methode, bei der ein Duftreiz über der Wahrnehmungsschwelle dargeboten wird und die Testperson sich für eine der vorgegebenen Antwortmöglichkeiten entscheiden muss, wie beim Identifikationstest (Hummel et al., 1997). Zum anderen wird für die Geruchsdiskrimination die „three alternative forced choice“ Methode verwendet, bei der die Testperson entscheiden soll, welcher Duft aus Dreien unterschiedlich ist, wobei zwei gleich sind (Lotsch, 2004). Psychophysische Tests sind zwar klinisch als Screening-Untersuchungen für Riechstörungen etabliert (Hummel et al., 2007), jedoch ist man hierbei auf die Kooperation und Compliance, sowie das intellektuelle Verständnis der Testperson angewiesen.

Mithilfe von elektrophysiologischen Messverfahren hat man hingegen die Möglichkeit, objektive Ergebnisse über die Vorgänge während des Riechens zu erheben. Zu diesen elektrophysiologischen Testverfahren gehört die Ableitung von Elektroolfaktogrammen und olfaktorisch ereigniskorrelierten Potentialen.

2.4.1 Das Elektroolfaktogramm

2.4.1.1 Begriffserläuterung und Anwendung im Menschen

Ein Elektroolfaktogramm (EOG) ist ein von einer Elektrode aufgenommenes lokales Feld-Potential, das direkt von dem olfaktorischen Epithel als Reaktion auf Stimulation mit einem Duftstoff abgeleitet werden kann (Lapid und Hummel, 2013) und das als summiertes Rezeptorpotential der Riechrezeptoren angesehen wird (Scott und Scott-Johnson, 2002; Knecht und Hummel, 2004). Die Begrifflichkeit „Elektroolfaktogramm“ wurde von Ottoson geprägt, der langsame, monophasisch negative Potentiale mittels einer Elektrode auf dem olfaktorischen Epithel von Fröschen in-vivo sichtbar machte (Ottoson, 1955).

Für die elektrophysiologische Untersuchung des olfaktorischen Epithels im Menschen nutzten Osterhammel und Kollegen diese Technik als Erste (Osterhammel et al., 1969). Kobal erweiterte und verbesserte diese Technik für die Anwendung und hielt sie dann als standardisierte Untersuchungsmethode in seiner Habilitationsschrift „Elektrophysiologische Untersuchungen des menschlichen Geruchssinns“ fest (Kobal, 1981). Das Ableiten von EOGs wurde im Menschen unter anderem genutzt, um die Ausbreitung des olfaktorischen Epithels in der menschlichen Nasenhöhle zu erforschen (Leopold et al., 2000). Eine regelhafte klinische

Anwendung hat sich bisher nicht etabliert. Bemerkenswert bei der Anwendung am Menschen ist, dass EOGs aufgezeichnet werden können, obwohl der Duftreiz unter dem wahrnehmbaren Schwellenwert liegt (Hummel et al., 2006). Als Herausforderung hierbei zeigten sich die Erfolgsraten in der Erhebung, die trotz korrektem Versuchsaufbau und endoskopischer Lagekontrolle der Elektrode zwischen 60-80% lagen (Hummel et al., 1996; Lapid und Hummel, 2013). Desweiteren zeigte sich eine hohe interindividuelle Variabilität zwischen einzelnen Testpersonen (Lapid et al., 2009).

2.4.1.2 Biophysikalischer Ursprung und Charakterisierung des EOG

Es kommt an dem ORN durch die Aktivierung eines Rezeptorproteins durch ein Duftmolekül und dem sich daran anschließenden zellulären Transduktionsmechanismus zu einer Depolarisation der Zelle. Wenn mehrere ORNs nebeneinander gleichzeitig aktiviert werden, kann eine extrazellulär eine negative Spannungsschwankung, ein Potential, mit einer Elektrode abgeleitet werden (Lapid und Hummel, 2013). Jedoch gibt es kontroverse Diskussionen, ob nicht auch andere Zellen des olfaktorischen Epithels, die durch die Aktivierung der ORN gereizt werden, einen zur Entstehung des Potentials oder dessen Veränderung beitragen (Scott und Scott-Johnson, 2002).

Das EOG ist charakterisiert durch einen initial schnellen, negativen Abfall gefolgt von einer langsamen Rückkehr zum ursprünglichen Ruhepotential (siehe Abbildung 10). Bei der genaueren Beschreibung eines EOGs ist auf die Latenzzeit (in Millisekunden), die Amplitude (in Millivolt) und die Gesamtdauer bzw. die Erholungsphase (in Sekunden) einzugehen (siehe dazu auch 3.6).

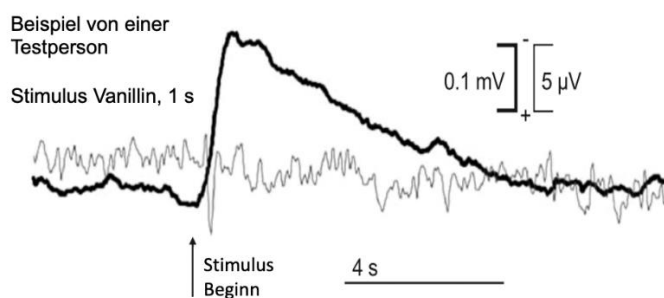


Abbildung 10: Typische Antwort im EOG auf einen Duftreiz (entnommen aus Knecht und Hummel, 2004)

Mit steigender Duftstoffkonzentration nimmt die Latenzzeit des EOG ab (Kobal, 1981). Die Amplitude erhöht sich bei zunehmender Duftstoffkonzentration (Ottoson, 1955; Kobal, 1981), wobei man sich über das Maß und die genaue Art der Zunahme in der Forschung nicht einig ist. Schon Ottoson beschrieb, dass die Amplitude je nach Lokalisation der Elektrode auf dem olfaktorischen Epithel eine unterschiedliche Höhe aufweist, was auf eine unterschiedliche

Rezeptordichte der ORNs zurückzuführen ist (Leopold et al., 2000; Lapid et al., 2011). Die Rekurrenz zum Ruhepotential ist duftspezifisch (Lapid et al., 2009) und wird durch spezifische Reinigungsmechanismen des Epithels und unterschiedliche Dissoziationsmechanismen des Duftstoffes erklärt (Scott und Scott-Johnson, 2002; Lapid et al., 2009).

Manche Autoren berichteten zusätzlich über einen positiven transienten Anstieg im EOG (Ottoson, 1955; Takagi und Shibuya, 1959; Getchell, 1974), bis hin zu gänzlich positiven Antworten (Gesteland et al., 1965). Es wird angenommen, dass diese positiven Anstiege unter anderem durch Atemartefakte (Scott und Scott-Johnson, 2002), mechanosensorische Aktivierung (Lapid und Hummel, 2013), sekretorische Prozesse der Stützzellen (Okano und Takagi, 1974) und hemmende Antworten der ORN (Gesteland, 1964) bedingt sind. Das durch eine trigeminale Reizung entstehende und ebenfalls von der Messelektrode abgebildete Negative Mukosa Potential (NMP) kann graphisch von einem EOG nicht unterschieden werden (Hummel, 2000; Knecht und Hummel, 2004).

2.4.2 Das olfaktorisch ereigniskorrelierte Potential

2.4.2.1 Begriffserklärung und Anwendung im Menschen

Ein Elektroenzephalogramm (EEG) ist eine durch Elektroden auf der Kopfoberfläche aufgenommene graphische Darstellung von Potentialschwankungen des elektromagnetischen Feldes im Gehirn, das durch die elektrische Aktivität von Nervenzellen entsteht. Potentialänderungen im EEG, die auf einen spezifischen Reiz hin folgen, nennt man ereigniskorrelierte Potentiale (eng: Event Related Potentials). Olfaktorisch induzierte, ereigniskorrelierte Potentiale (OEPs) sind aus dem EEG ablesbare polyphasische Signale auf einen spezifischen olfaktorischen Duftreiz und gehören zu der Gruppe chemosensorisch ereigniskorrelierter Potentiale (CSEPs) (Kobal und Hummel, 2001). CSEPs entstehen durch Reizung mit Duftstoffen, die sowohl eine trigeminale als auch eine olfaktorische Komponente enthalten können (Kobal und Hummel, 1988). Ereigniskorrelierte Potentiale, die bei Stimulation mit einem rein trigeminalen Reizstoff entstehen, werden als chemosomatosensorisch ereigniskorrelierte Potentiale (CSSEPs) bezeichnet (Welge-Lüssen, 1999).

Finkenzeller und später Allison und Goff wiesen als Erste OEP im EEG nach (Finkenzeller, 1966; Allison und Goff, 1967). Kobal und Plattig entwickelten dann eine olfaktometrische Technik, mit der die Duftstoffe intranasal appliziert wurden ohne eine trigeminale Reizung durch mechanische oder thermische Stimuli hervorzurufen (Kobal und Plattig, 1978; Kobal, 1981). Kobal hielt auch diese Technik als standardisierte Untersuchungsmethode in seiner zuvor schon erwähnten Habilitationsschrift „Elektrophysiologische Untersuchungen des menschlichen Geruchssinns“ fest (Kobal, 1981). Das Aufzeichnen von CSEPs hat sich für die

klinische Untersuchung zur Diagnostik einer funktionellen Anosmie und zur Detektion von Simulanten als Differentialdiagnose zur kompletten Anosmie etabliert (Welge-Lüssen, 1999). Bei einer kompletten Anosmie ist es nicht möglich OEPs zu detektieren, während jedoch CSSEPs auslösbar sind (Hummel et al., 1991; Cui und Evans, 1997).

2.4.2.2 Charakterisierung des OEPs

Durch die hohe Aktivität von Neuronen im Gehirn stellt sich das EEG zuerst als Signal mit einem großen Grundrauschen dar, aus dem es ereigniskorrelierte Potentiale zu extrahieren gilt. Dazu werden die Signale von mindestens 8 Messungen gemittelt, sodass das Grundrauschen wegfällt und somit das Potential herausgefiltert werden kann (Kobal, 1981). Wenn viele kortikale Neuronen durch einen Reiz gleichzeitig aktiviert werden, resultiert das in einem größeren Ausschlag des mit dem EEG detektierbaren Signals (Kobal und Hummel, 2001). Deshalb wird im Versuchsaufbau der Reiz mit einer Anstiegszeit <20 ms in einer kontrollierten Umgebung gegeben (siehe 3.5.4). OEPs werden als späte Nahfeldpotentiale klassifiziert, da die gemessenen Potentiale nah der ableitenden Elektrode in kortikalen Bereichen des Gehirns entstehen (Kettenmann et al., 1997; Hummel et al., 2000).

Wie oben für EOG beschrieben, hat auch das OEP ein charakteristisches Amplitudenbild, das einheitlich nach der Reihenfolge des Auftretens der Amplituden und deren Polarität beschriftet wird (Evans et al., 1993) (siehe hierzu 3.6). Der erste negative Peak (N1) wird dabei von den Charakteristika des Duftreizes an sich, wie der Intensität und der Stimulusdauer beeinflusst, und wird als exogene Komponente bezeichnet (Pause et al., 1996). Hingegen enthält der zweite positive Peak (P2) Informationen über die nachgeschalteten Reizverarbeitungsprozesse, die zum Beispiel mit der Vertrautheit des Geruches assoziiert sind (Picton, 1988). Graphisch können CSEPs, die durch Reizung mit trigeminalen Duftstoffen, von denen, die durch Reizung mit olfaktorischen Duftstoffen entstehen, nicht unterschieden werden (Kobal, 1981), jedoch aktivieren sie unterschiedliche Regionen im Gehirn. Bei Stimulation mit trigeminalen Reizen kann eine Aktivierung des sekundären somatosensorischen Kortex beobachtet werden (Hari et al., 1997), wohingegen bei olfaktorischen Reizen Anteile der Insula, der parainsulare Kortex und der Sulcus temporalis superior aktiviert werden (Huttunen et al., 1986; Kettenmann et al., 1997).

2.5 Zielstellung

Dieser Arbeit liegt die Fragestellung zugrunde, ob Menschen im olfaktorischen Epithel Rezeptoren für HLA-assoziierte Peptide haben. Dabei wird angenommen, dass dieser Rezeptor eine spezifische Struktur zum Erkennen von Nonapeptiden hat, die durch zwei Schlüsselpositionen in der Aminosäuresequenz bestimmt werden. Dadurch könnten Nonapeptide aller HLA-Typen erkannt werden.

Daraus ergeben sich folgende für diese Arbeit relevanten Fragestellungen.

- Sind HLA-assoziierte Peptide im Aerosol des Olfaktometers volatil?
- Können HLA-assoziierte Nonapeptide von Menschen diskriminiert werden?
- Aktivieren HLA-assoziierte Nonapeptide olfaktorische Rezeptoren in der humanen Riechschleimhaut und kann man eine Reizantwort der Rezeptoren elektrophysiologisch nachweisen?
- Gibt es nach Stimulation mit Nonapeptiden eine olfaktorische Reizverarbeitung im Gehirn und wenn ja, wie sieht diese Reizverarbeitung aus?

3 Material und Methodik

3.1 Auswahl der Testpersonen und Teilnahme Kriterien

Die Testpersonen wurden durch Aushänge am Uniklinikum Dresden und öffentliche Aufrufe via E-Mails und Facebook akquiriert.

Es wurden 24 männliche und 28 weibliche Studienteilnehmende im Alter von 20-33 Jahren, rekrutiert, die keine wesentlichen gesundheitlichen Einschränkungen hatten und zu dem Zeitpunkt nicht schwanger oder stillend waren. Ein normales Riechvermögen wurde durch einen Identifikationstest mittels „Sniffin‘ Sticks“ (Hummel et al., 1997) bestätigt. Eine unauffällige nasale Endoskopie ohne pathologische Auffälligkeiten war ebenfalls Voraussetzung.

Alle Teilnehmenden wurde vor Beginn der Studie ausführlich über den Ablauf und die vorliegenden Datenschutzbestimmungen aufgeklärt. Die Einwilligung in die Studie wurde schriftlich festgehalten und die Anonymisierung der Daten, die vertrauliche Behandlung, sowie das Widerspruchsrecht wurde zugesichert. Die Testpersonen konnten die Untersuchung jederzeit und ohne Angaben von Gründen beenden.

Die Studie wurde gemäß den Vorgaben der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Vor Beginn der Studie wurde der Ethikantrag EK359082016 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Carl-Gustav-Carus der Technischen Universität Dresden bewilligt.

3.2 Studienablauf

Die Studie unterteilte sich in eine psychophysiologische und eine elektrophysiologische Untersuchung, die an einem Termin nacheinander durchgeführt wurden.

Zunächst wurde ein Geruchsidentifikationstest mittels „Sniffin‘ Sticks“(Hummel et al., 1997) angewendet. Dann wurde eine Drei-Gläser Probe durchgeführt, in der zur Identifikation die Peptide im Vergleich zu Lösungsmittel präsentiert wurden. In der elektrophysiologischen Untersuchung wurden mittels einer Elektrode am Riechepithel der Nasenschleimhaut während der olfaktometrischen Stimulation mit verschiedenen bekannten Reizstoffen, den Peptiden sowie dem Lösungsmittel lokale Potentialänderungen gemessen. Gleichzeitig wurde auch ein EEG aufgezeichnet, um zentralnervöse Reaktionen erkennen zu können.

Der Zeitaufwand für den Versuchsablauf betrug maximal anderthalb Stunden und die Teilnehmenden erhielten eine Aufwandsentschädigung von zehn Euro.

3.3 Die Nonapeptide

Die drei Nonapeptide erhielten wir durch unseren Kooperationspartner Prof. Dr. Thomas Boehm aus dem Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik in Freiburg in gefriergetrockneter Form mit Qualitätsanalysen durch Thermo Fisher (siehe Anhang 1).

Es handelt sich um Peptide - bestehend aus neun Aminosäuren mit unterschiedlichen Aminosäuresequenzen und unterschiedlichen Molekularmassen.

Tabelle 1: Peptide, Sequenz in single letter code

	Peptid 1	Peptid 2	Peptid 3
Sequenz	[NH ₂]SLLPAIVEL [COOH]	[NH ₂]KYPENFFLL[CO OH]	[NH ₂]KAPENFFLA[CO OH]
Molekülmasse	954.18 Da	1170.38 Da	1036.20 Da
HLA-Typ	A* 0201	A* 2402	keiner

Peptid 1 und 2 sind passend zu den HLA-Klassen ausgewählt, die in Deutschland häufig vorkommen (Schmidt et al., 2010). Dahingegen ist das dritte Peptid durch seine Aminosäuresequenz strukturell so verändert, dass es nicht zu dem Rezeptor passen sollte und zu keiner HLA-Klasse passt. In den Schlüsselpositionen 2 und 9 ist die Aminosäure Alanin (A) anstatt von Leucin (L) und Tyrosin (Y) zu finden.

3.3.1 Aufbereitung der Nonapeptide

Die in gefriergetrockneter Form transportierten Peptide wurden mit einer geruchslosen 1% Phosphatgepufferten-Salzlösung (PBS-Lösung) mit CaCl₂ und MgCl₂ zu einer 125 µM Ausgangslösung verdünnt. Diese drei Ausgangslösungen wie auch das 1% PBS-Lösung wurden in 4 ml Portionen in beschrifteten geruchslosen Plastikröhrchen abgefüllt, von einer externen Person für die Versuchsleiterin verblindet und bei -20°C eingefroren. Am Tag des Versuches wurde dann jeweils eine Probe der Peptide und des Lösungsmittels aufgetaut und wiederum mit der 1% PBS-Puffer-Lösung zu einer 25 µM Arbeitslösung verdünnt. Diese Arbeitslösung wurde in die Kammern des Olfaktometers eingefüllt. Für die Drei-Gläserprobe wurde dann das Lösungsmittel von der externen Person, die auch die Verblindung durchgeführt hatte, kenntlich gemacht, damit die Peptide mit dem Lösungsmittel verglichen werden konnten.

3.3.2 Volatilitätstestung der Nonapeptide

Um die Volatilität der Nonapeptide nachzuweisen, wurde mit Dr. Bergoi Ibarlucea vom Max-Liebermann-Institut in Dresden zusammengearbeitet. Dem Versuch lag der Gedanke zugrunde, dass, wenn die Nonapeptide im Aerosol des Olfaktometers volatil sind, sie folglich auch im Kondensat dieses Aerosols zu finden sein müssten. Demnach müssten sowohl in der

Arbeitslösung (siehe 3.3.1), die in das Olfaktometer eingefüllt wurden, als auch in den vom Olfaktometer kondensierten Lösung, das in die Nase der Testpersonen geleitet wurde, die Peptide nachzuweisen sein.

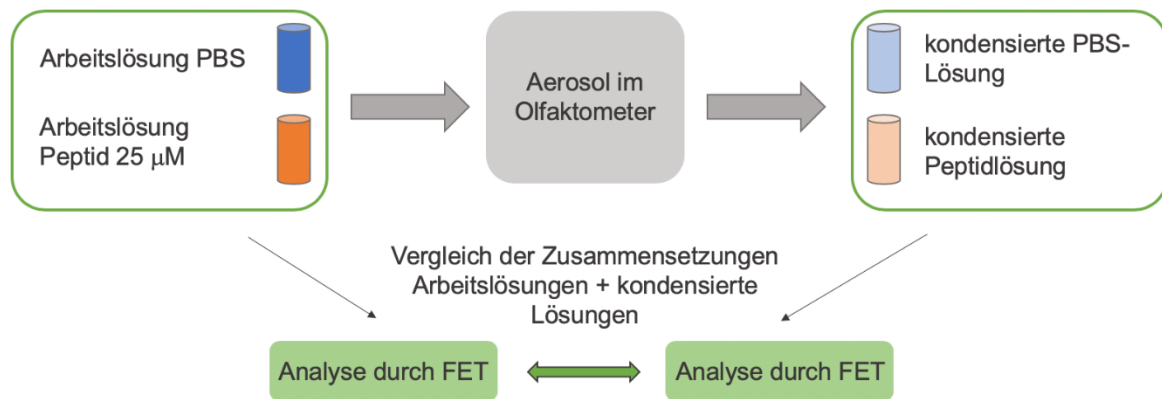


Abbildung 11: schematische Darstellung der Volatilitätstestung. Die Arbeitslösungen des Peptides und des Phosphatpuffers (PBS) wurden in das Olfaktometer eingefüllt, dort in Aerosol umgewandelt und es wurde aus dem Olfaktometer die kondensierten Lösungen des Peptides und des PBS gewonnen. Durch den Feld Effekt Transistor (FET) wurden sowohl die Arbeitslösungen und die kondensierten Lösungen analysiert und deren Zusammensetzungen miteinander verglichen. Wenn die Peptide im Aerosol des Olfaktometers volatil wären, müssten sie sowohl in der Arbeitslösung als auch in der kondensierten Lösung nachzuweisen sein.

Zur Analyse der Arbeitslösungen und kondensierten Lösungen wurde ein Nanosensor genutzt, der aus wabenförmig angeordneten, halbleitenden Nanofäden aus Silikon besteht, die mit einem Feld-Effekt-Transistor (FET), einem drei Elektroden System, verbunden sind (Chen et al., 2011; Ibarlucea et al., 2017). Wird eine Spannungsdifferenz zwischen zwei Elektroden angelegt, fließt durch die halbleitenden Nanofäden elektrischer Strom, der gemessen werden kann. Wenn geladene Ionen oder Moleküle in einer Lösung auf den Nanosensor gegeben werden, ändert sich die Ladungsverteilung in den Nanofäden und somit auch der von den Fäden geleitete Strom. Gibt man positiv geladene Moleküle hinzu, kumulieren Elektronen in den Nanofäden und es fließt mehr elektrischer Strom. Analog dazu werden Elektronen in den Nanofäden bei Zugabe von negativ geladenen Molekülen abgestoßen und der Stromfluss verringert sich. Die Änderung des Stromes hängt also gleichbleibender Spannung nur von der Ladung applizierter Moleküle ab.

In diesem Versuch wurde eine gleichbleibende Spannung angelegt und zunächst der Stromfluss des Nanosensors bei Zugabe von der PBS-Puffer-Lösung bestimmt. Danach wurde die 25 µM Arbeitslösung des Peptides 1 hinzugegeben und die Änderung des Stromflusses aufgezeichnet. Da die Peptide sich aus neun spezifischen Aminosäuren zusammensetzen und diese jeweils eine gewissen Polarität haben, entsteht durch deren Anlagerung an die halbleitenden Nanofäden eine Änderung deren Ladungsverteilung, die durch eine Stromflussdifferenz bestimmt werden konnte. In einer zweiten Messung erfolgte dieser

Versuchsablauf analog für die aus dem Olfaktometer gewonnenen Kondensate von der PBS-Lösung und der Lösung des Peptides 1.

3.4 Psychophysische Untersuchung

3.4.1 Geruchsidentifikationstest

Die Geruchsidentifikation wurde mittels der „Sniffin' Sticks“ (Hummel et al. 1997) getestet. Dabei werden der Testperson 16 verschiedene Gerüche in Stiftform von der Handschuhe tragenden Versuchsleiterin unter der Nase präsentiert. Es wurden zu jedem Geruch vier Antwortmöglichkeiten als Bilder vorgelegt, von denen eine die gesuchte war. Die Testperson wählte die Antwortmöglichkeit aus, die für sie am ehesten zutraf. Die erreichte Punktzahl ergibt sich aus der Anzahl der korrekt identifizierten Gerüche, folglich konnten ein Identifikationswert (I-Wert) zwischen 0 und 16 erreicht werden. Ab einer Punktzahl von 12 wurden die Testpersonen in die Studie eingeschlossen.



Abbildung 12: "Sniffin' Sticks", mit Duftstoffen gefüllte Stifte, die von den Testpersonen zu den Gerüchen der passenden Abbildungen zugeordnet werden sollen.

3.4.2 Drei-Gläser-Probe

Die Diskriminationstestung der Peptide zur Pufferlösung basierte auf der „three alternative choice Methode“ (siehe 2.4). Der Testperson wurden nacheinander drei verschiedene Gläser mit Gerüchen dargeboten, die zweimal das 1% Lösungsmittel beinhaltete und einmal das jeweilige für die Versuchsleiterin verblindete Peptid. Dann entschied die Testperson, welcher Geruch sich von den beiden anderen unterschied. Während des Versuchs trug die Testperson eine Augenbinde und die Handschuhe tragende Versuchsleiterin präsentierte die Gläser nacheinander vor der Nase. Der Versuch wurde in verschiedenen Reihenfolgen pro Peptid 10-mal wiederholt, insgesamt betrug die Versuchsreihe folglich 30 Diskriminationen. Es wurde gezählt und festgehalten wie oft die Testperson in der Lage war die Peptide richtig von dem Lösungsmittel zu unterscheiden.

Während des Versuches gab es eine Änderung der Versuchsreihe der Drei-Gläser-Probe. Zu Beginn wurden die eingefrorenen drei Peptide und Lösungsmittel, die unkenntlich gemacht wurden, mit frischem Lösungsmittel verglichen. Dabei stellte sich bei Betrachtung der Daten nach 33 Testungen heraus, dass die Testpersonen durchschnittlich sowohl die Peptide als auch das zuvor eingefrorene Lösungsmittel vom frisch zubereiteten Lösungsmittel unterscheiden konnten. Daraufhin wurde der Testablauf dahingehend geändert, dass das eingefrorene Lösungsmittel nach dem Einfüllen in das Olfaktometer kenntlich gemacht wurde. Dieses wurde dann zur Diskrimination zu den Peptiden verwendet. Damit wurde ausgeschlossen, dass eine Geruchskontamination durch die Plastikröhrchen oder durch das Zubereiten des frischen Lösungsmittelgemisches die Drei-Gläser Probe beeinflussen konnte. Die Testpersonen wurden nachträglich noch einmal einbestellt, jedoch wurden einige dabei nicht mehr erreicht.

3.5 Elektrophysiologische Untersuchung

3.5.1 Training der velopharyngealen Atemtechnik

Bevor der Versuch aufgebaut werden konnte, wurde sichergestellt, dass die Testpersonen die sogenannte velopharyngeale Atemtechnik (Kobal, 1981) beherrschten. Diese Technik beinhaltet den Verschluss der Nasopharynx durch den weichen Gaumen, sodass die Testperson nur durch den Mund atmet und keine Luft durch die Nase strömt. Diese Atemtechnik ist während der gesamten Messung anzuwenden, damit nur Luft und Duft aus dem Nasenstück des Olfaktometers (3.5.4) in die Nase strömt und nicht aus der Umgebung. Zusätzlich käme es durch das Nasenatmen zu Artefakten an der Elektrode. Aus den beiden Gründen ist es erforderlich, dass die Testperson die velopharyngeale Atemtechnik sicher beherrscht (Leopold et al., 2000). Dafür wurde an dem Gerät Analog Oscilloscop 630-2 (VOLTCRAFT, Conrad Electronic AG, Wollerau, Schweiz) zunächst die Atemtechnik von dem Versuchsleiter erklärt und demonstriert. Dann übt er sie zusammen mit der Testperson ein. Die erfolgreiche Anwendung der Technik kann durch einen Termistor (Heinemann, Starnberg) in der Spitze des Messgerätes kontrolliert werden, der Änderungen der Temperatur misst und auf diese Weise einen eventuell vorhandenen Luftstrom aus der Nase detektieren kann. Dieser Sensor wird jeweils unter ein Nasenloch platziert und kann den vorhandenen Luftstrom so visualisieren.

3.5.2 EOG- und OEP-Gewinnung

Ziel der elektrophysiologischen Untersuchung ist es, lokale Potentialänderungen an der Riechschleimhaut, sogenannte Elektroolfaktogramme (EOG), und zentrale Potentialänderungen im Gehirn, sogenannte olfaktorisch ereigniskorrelierte Potentiale (OEP), folgend auf Stimulation mit verschiedenen Gerüchen aufzuzeichnen.

Dazu nahm die Testperson in sitzender Position in einer möglichst für sie angenehmen Haltung auf dem Untersuchungsstuhl Platz. Die Kopf-Elektroden (Grass Technologies, Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA) wurden nach dem standardisierten 10/20 System angebracht (Klem et al., 1999). Zunächst wird der Kopf abgemessen, um zu bestimmen, an welcher Position die frontale (Fz), zentrale (Cz) und okzipitale (Pz) EEG Elektrode platziert werden müssen. Die Positionen für die Elektroden werden mit einer Paste (Skin pure, Nihon Koden, Tokyo, Japan) gereinigt und danach die EEG-Elektroden mit einer Elektrodencreme (EC2TM, Grass Instruments Division, Astro Med Inc., Warwick, RI, USA) auf der Kopfhaut platziert. Dabei dienen die Elektroden an den Ohrläppchen als Referenzelektroden und die beiden Elektroden auf den Mastoiden der Erdung. Die Elektrode über Augenbraue befindet sich auf derselben Seite wie die EOG-Messelektrode und dient dazu, Artefakte, die durch Augenzwinkern und Augenbewegung entstehen, aufzuzeichnen, damit man diese in der Auswertung berücksichtigen und eliminieren kann. Unter endoskopischer Sicht wurde die zuvor erstellte Messelektrode (3.5.3) in die Nase vorgeschoben und immer oberhalb der mittleren Nasenmuschel in der Regio olfactoria platziert (Leopold et al., 2000), weil dort die Rezeptordichte der olfaktorischen Zellen am höchsten ist. Dabei wurde die Nasenseite gewählt, die einen leichteren Zugang ermöglichte. Zuletzt wurde die Elektrode in einem speziellen Brillengestell befestigt, damit sie während der Messung nicht verrutscht.

Der Reiz wurde jeweils mit einer Reizvorlaufzeit von 500 ms für die Dauer von 500 ms intranasal gesetzt. Die gesamte Aufzeichnungsdauer für das einzelne EOG nach einem Reiz betrug 8,2 s bei einer Abtastfrequenz Frequenz 125 Hz und einem Band-pass Filter von 0.01-15 Hz. Zwischen den Reizen lag ein definiertes Interstimulusintervall (ISI) von 45 s. Die EEG-Signale wurden mithilfe eines 14-Kanal-Verstärkers aufgenommen (Neurofax, Nihon Kohden, Japan). Dabei betrug die Abtastfrequenz 125 Hz und es wurde ein Band-pass-Filter von 0.01-15 Hz eingesetzt. Die Gesamtdauer der Aufnahmezeit der reizkorrelierten EEG-Abschnitte betrug 2048 ms.

3.5.3 Messelektrode

Die Messelektrode für die Riechschleimhaut wurde immer unmittelbar vor Versuchsbeginn hergestellt. Zunächst wurde ein circa 7-10 cm langer Silberdraht an das offenliegende Ende eines Drahtes einer EEG-Elektrode gelötet. Danach wurde die Oberfläche des Drahtes mit feinem Schleifpapier angeraut und anschließend in einer NaCl-Lösung chloriert. Dazu wurde die Elektrode an eine 5 Volt Batterie angeschlossen, die somit die Anode bildete, und dann so lange in die Lösung gehalten, bis sie sich außen sichtbar schwarz färbte. Dadurch wurde die erfolgreiche Chlorierung bestätigt. Die Kathode wurde durch eine EEG-Elektrode gebildet, die ebenfalls in die Lösung gehängt wurde (siehe Abbildung 14). In einem nächsten Schritt wurde

ein Teflonschlauch mit Außendurchmesser 0,6 mm mit einer frisch aufgekochten und flüssigen 1% Agarlösung befüllt und anschließend die Elektrode in den Schlauch geführt, sodass dieser den Silberdraht bedeckte und über dessen Spitze hinausragte. Der Übergang zwischen Kabel und Teflon Schlauch wurde sorgfältig isoliert und dann durch ein aufgebrachtes Stück Klebeband vor dem Verrutschen gesichert (siehe Abbildung 13). Zuletzt wurde der Teflon Schlauch mit einem Skalpell kurz vor dem Beginn der Silberdrahtelektrode abgeschnitten, sodass noch eine Agarbrücke im Schlauch verblieb (Kobal, 1981).

Nasenelektrode

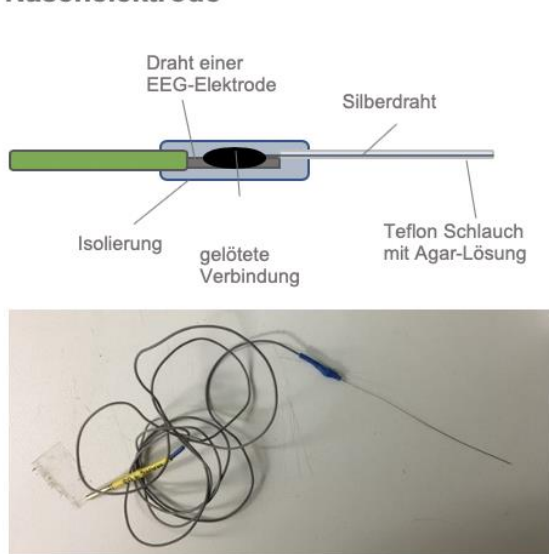


Abbildung 13: schematische Darstellung und Fotodokumentation einer Nasenelektrode.

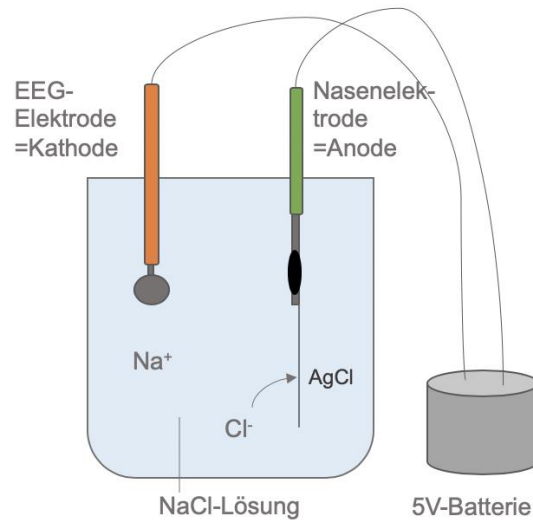


Abbildung 14: Chlorierungsvorgang an der Silberelektrode.

3.5.4 Olfaktometer

Das Olfaktometer ist ein computersteuerbares Gerät der Firma Burghart Instruments (OM6b, Abbildung 16), mit dessen Hilfe die Dauer, Konzentration, Flussgeschwindigkeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit eines Duftreizes in Form eines strömenden Gases oder verdampften Duftstoffes beeinflusst und definiert werden kann. Hierbei fließt ein Kontrollgas, das geruchsfrei ist, konstant und nur für die Dauer des Reizes wird das verdünnte Duftgasgemisch in das Nasenstück geleitet, wobei das Umschalten für die Testperson unmerklich abläuft (siehe Abbildung 15). Beide Gasgemische fließen mit dem gleichen Luftstrom.

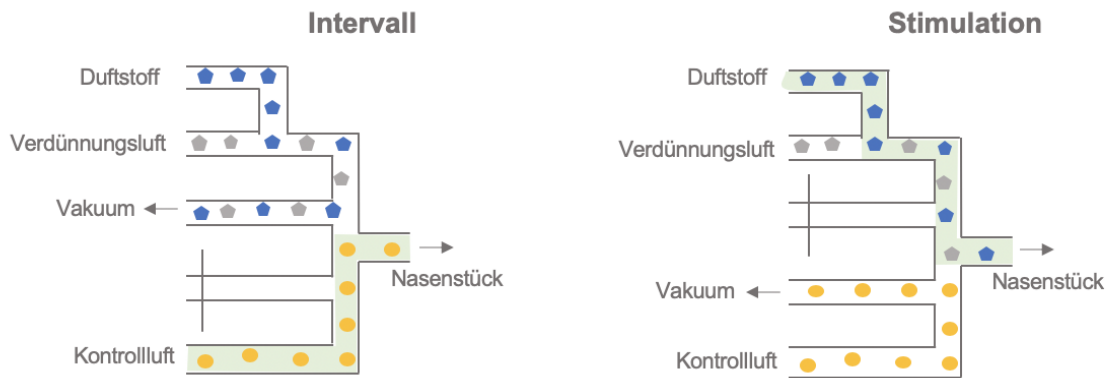


Abbildung 15: schematisches Prinzip des Olfaktometers. Im Interstimulusintervall fließt die geruchslose Kontrollluft zum Nasenstück während das Duftgasgemisch (Duftstoff und Verdünnungsluft) von einem Vakuum abgesaugt wird. Jedoch bei der Stimulation wird die Kontrollluft von dem Vakuum abgesaugt, während das Duftgasgemisch in das Nasenstück geleitet wird. Dabei sind die Luftströme der Kontrollluft und des Duftgasgemisches gleich. (modifiziert nach Kobal und Hummel, 2001)

Dabei kann durch das Olfaktometer das natürliche Nasenmilieu mit Erwärmung des Gasgemisches auf Körpertemperatur und Befeuchtung des Luftstromes durch erwärmtes Wasser imitiert werden. Diese drei Faktoren (Temperatur, Luftfeuchtigkeit und konstanter Luftstrom) sind elementar wichtig, um eine trigeminale Reizung zu verhindern (Lapid und Hummel, 2013). Das durch eine trigeminale Reizung entstehende und von der Messelektrode abgebildete Negative Mukosa Potential (NMP) kann nicht von einem EOG unterschieden werden (Hummel, 2000; Knecht und Hummel, 2004). Deshalb ist die korrekte Einstellung und Benutzung des Olfaktometers für eine elektrophysiologische Messung an der Nasenschleimhaut zwingend notwendig.

Durch ein Nasenstück, das durch einen Schlauch bis in die Nase der Testperson reicht, wird das so generierte angefeuchtete und angewärmte Gasgemisch direkt in die Nase geleitet, wo dann eine isolierte Potentialmessung auf den Duft-Reiz durch die Messelektrode an der Nasenschleimhaut in der Regio olfactoria erfasst wird. Während der gesamten Dauer der Messung wendet die Testperson die velopharyngeale Atemtechnik an (3.5.1), damit keine Artefakte durch die Nasenatmung entstehen und sie hat die Augen geöffnet, da sich bei Augenschluss veränderte EEG-Signale ergeben können. Damit das Klicken des Olfaktometers, das den Wechsel von Kontrollluft zum Duft-Reiz signalisiert, die Testperson nicht akustisch auf den Duft-Reiz vorbereitet, tragen die Testpersonen für die Länge der Sitzung Kopfhörer mit einem sogenannten „White Noise“, einem Rauschgeräusch von ungefähr 70 dB.



Abbildung 16: Olfaktometer mit Computer.

3.5.5 Gasgemische

Für die Testreihe wurden 6 verschiedene Gasgemische verwendet:

Kohlendioxid (CO₂) (Air Liquide, Ottendorf-Okrilla)

2-Phenylethylalkohol (PEA) (CAS 60-12-8, Sigma-Aldrich Chemistry, Steinheim, Deutschland)

Peptid 1 (25 µM Arbeitslösung in 1% PBS) (3.3.1)

Peptid 2 (25 µM Arbeitslösung in 1% PBS)

Peptid 3 (25 µM Arbeitslösung in 1% PBS)

1% PBS

CO₂ wurde bei 25 Testpersonen verwendet und als rein trigeminaler Stimulus eingesetzt (Kobal und Hummel, 1998). CO₂ löst als intensiver Reizstoff ein starkes Signal an der Nasenschleimhaut hervor, das auch durch die Messelektrode gut sichtbar wird (Scheibe et al., 2006). Das diente im Versuchsablauf als direkte visuelle Kontrolle, ob sich die Elektrode an der Nasenschleimhaut befindet, die gänzlich vom Trigemminus innerviert ist. PEA ist synthetisch hergestellter Rosenduft und wirkt als olfaktorischer Reiz. PEA ist in der EOG Gewinnung als olfaktorischer Duftstoff etabliert, weil er eine geringe trigeminale Reiz-Komponente hat. Durch die Ableitung von EOGs bei Stimulation mit PEA konnte in der Auswertung kontrolliert werden, ob die Elektrode auf dem Riechepithel der Regio olfactoria lag, weil nur dort EOGs ausgelöst werden können (Leopold et al., 2000). Die Peptidlösungen und die Pufferlösung wurden in randomisierter Reihenfolge appliziert.

3.5.6 Versuchsablauf

Aus der 6 verschiedenen Gasgemischen ergeben sich 6 Reizklassen. Der Reiz jeder Klasse wurde nach einer Latenz von 500 ms für eine Dauer von 500 ms appliziert. In der vorliegenden Testreihe wurde die Temperatur des Olfaktometers auf 37°C eingestellt, die Luftfeuchtigkeit auf 80% und der Luftstrom auf 6 l/min. Es wurde mit der Applikation von 4 Reizen CO₂ mit einem Interstimulusintervall (ISI) von 45 s begonnen. Wenn keine Reizantwort auf CO₂ zu sehen war, wurde die Lage der Messelektrode unter endoskopischer Sicht korrigiert. Dies wurde wiederholt, bis eine Reizantwort zu sehen war. Darauf folgten im Versuch 10 Reize PEA mit einem ISI von 30 s. Die Peptidlösungen und die Pufferlösung wurden danach in pseudorandomisierter Reihenfolge jeweils achtmal mit einem ISI von 45 s appliziert (siehe Abbildung 17).

Daraus ergibt sich eine Gesamt-Versuchsdauer von 32 min.

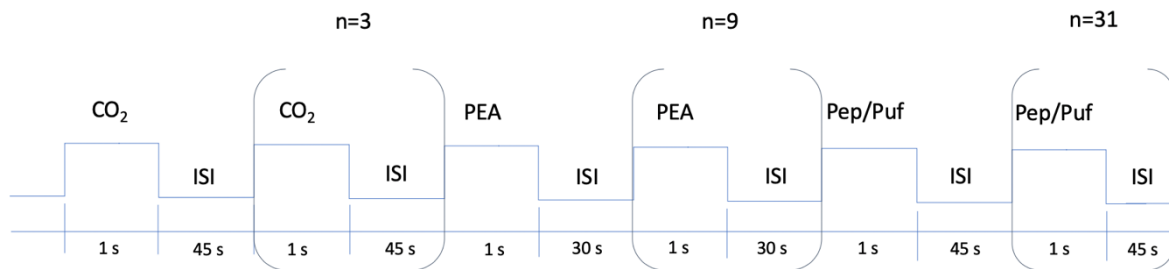


Abbildung 17: schematischer Versuchsablauf. Die Reize wurden mit einer Latenzzeit von 500 ms für eine Reizdauer von 500 ms appliziert, Gesamtzeit des Reizes also 1s. Danach folgte immer ein Interstimulusintervall (ISI). Zunächst wurde 4-mal CO₂, danach 10-mal PEA und dann 32-mal in randomisierter Reihenfolge die Peptidlösungen 1-3 (Pep) und die Pufferlösung (Puf).

3.6 Auswertung

Das Programm Epevaluatue (Version 4.2.2, Kobal, Erlangen) wurde zur Auswertung der Daten der EEG-Elektroden und der Messelektrode verwendet. Zunächst wurde ein Tiefpassfilter mit der Grenze 15 Herz festgelegt. Messungen, die durch Augenzwinkern oder Bewegungen Artefakte enthielten, wurden aussortiert und nicht in die Auswertung einbezogen. Wenn mindestens 3 Messungen vorhanden waren, wurden diese gemittelt. Waren weniger als 3 Messungen vorhanden wurde die ganze Messung als Artefakt vermerkt. Anhand dieser graphischen Mittelung wurden mehrere Punkte auf der Kurve markiert und ausgemessen. Diese unterschieden sich für das EOG und das OEP, weil dies grundsätzlich verschiedene Signale mit unterschiedlicher Charakteristik sind. Wenn kein Signal zu sehen war, wurde dies auch festgehalten.

Für die Antworten im EOG wurde die Punkte P1, N1, P2 festgelegt (Lapid et al., 2009; Lapid und Hummel, 2013).

P1 markierte hierbei den Beginn der negativen Amplitude der Reizantwort.
 N1 repräsentierte hierbei den negativen Tiefpunkt.
 P2 wurde bei zurückkehrendem Ruhesignal gesetzt.

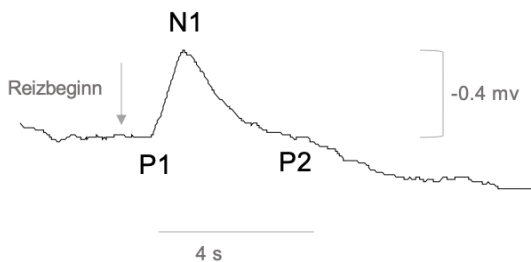


Abbildung 18: beispielhafte Markierung eines EOG für die Auswertung. Die Spannung wird mit dem negativen Pol nach oben angegeben.

Bei dem OEP wurden die Punkte P1, N1, P2 und N2 markiert (Kobal et al., 1992; Evans et al., 1993; Hummel et al., 2000).

P1 wurde bei Beginn der Reizantwort gesetzt.
 N1 markiert den ersten negativen Wendepunkt der Kurve.
 P2 zeigt den zweiten positiven Wendepunkt der Kurve.
 N2 wurde bei zurückkehrendem Ruhesignal gesetzt.

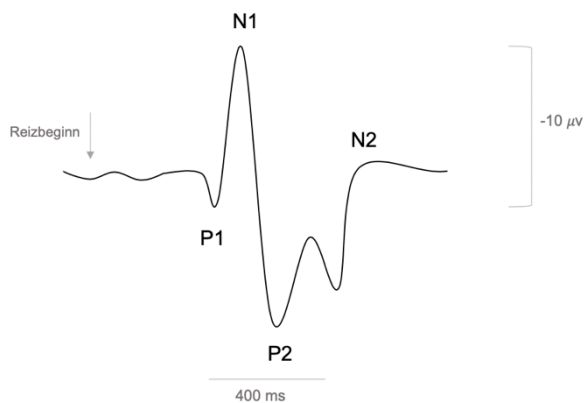


Abbildung 19 beispielhafte Markierung eines OEP für die Auswertung. Die Spannung wird mit dem negativen Pol nach oben angegeben.

Diese Punkte wurden mit den Koordinaten μV und ms in einer Datei abgespeichert. Um die Daten in einem Textverarbeitungsprogramm (Editor, Microsoft, Redmond, WA, USA) lesen zu können, wurden sie mithilfe des Programmes Labum (Kobal, Erlangen) umgewandelt. Die Editor Dateien wurde in Excel (Office Excel 2007, Microsoft, Redmond, WA, USA) eingelesen, um sie in einer Tabelle zu formatieren. Dabei wurden zur Charakterisierung der Potentiale die Werte für die Amplituden (EOG: $|P1-N1|$, OEP: $|N1-P2|$) und Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1, für OEP auch Reizbeginn bis N1 und Reizbeginn bis P2) festgehalten,

sowie ob überhaupt eine Reizantwort auszumachen war oder nicht. Nach der Auswertung des Datenmaterials der Elektroden wurde die Verblindung der Versuchsleiterin aufgehoben.

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Statistiksoftware SPSS (Statistics 25, IBM, Armonk, NY, USA). Für die Untersuchung der Häufigkeiten der Potentiale im EOG und EEG wurden Chi-Quadrat-Tests angewendet. Es wurden mittels t-Tests für abhängige Stichproben die Mittelwerte der Parameter miteinander verglichen, nachdem mittels eines F-test die Varianzhomogenität getestet wurde. Es wurden auch Korrelationen der Werte vorgenommen, um Zusammenhänge zu untersuchen.

Zusätzlich wurde von Cagdas Guducu, aus der Abteilung für Biophysik der medizinischen Fakultät der Dokuz Eylul Universität in Izmir (Türkei), eine Frequenzanalyse der Signale aus dem EOG und EEG vorgenommen, in der die Frequenzänderungen an sich betrachtet werden. Die Frequenzanalyse wurde ergänzend als weitere Auswertungsmethode gewählt, weil sie objektiver als die Auswertung mit Epevaluate ist.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der psychophysischen Testung sowie der elektrophysiologischen Testung - aufgeteilt in EOG und EEG - präsentiert und beschrieben.

4.1 Testpersonen und Identifikationstest

Es wurden 52 Testpersonen rekrutiert, von denen 28 weiblich (52,8%) und 24 männlich (46,2%) waren. Die Altersspanne reichte von 20-33 Jahren.

Tabelle 2: Mittelwerte für das Alter der Testpersonen und die erreichte Punktzahl im Geruchsidentifikationstest (I-Wert).

Gruppen	Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Gesamt	Alter	25.02	2.76
	I-Wert	14.19	0.10
Weibliche Testpersonen	Alter	24.50	2.46
	I-Wert	14.36	0.99
Männliche Testpersonen	Alter	25.38	3.09
	I-Wert	14.00	0.98

Weder das Durchschnittsalter zwischen männlichen und weiblichen Testpersonen ($t(50) = 0.86, p = 0.40$) noch die Ergebnisse im Geruchsidentifikationstest ($t(50) = 1.30, p = 0.20$) (siehe 3.4.1) waren signifikant unterschiedlich.

4.2 Volatilitätstestung

Bei der Messung mittels des FETs wurde der durch die konstant angelegte Spannung entstandene Stromfluss (I) aus dem Nanosensor der aus dem Olfaktometer kondensierten PBS-Lösung als Referenz genommen. Bei der Zugabe von PBS-Lösung zur PBS-Lösung zu Kontrollzwecken erfolgte keine Änderung des Stromflusses (Abbildung 20 schwarz). In einem nächsten Versuch wurde zu der PBS-Lösung die Arbeitslösung von Peptid 1 mit einem Molekulargewicht von 954,18 Da gegeben und es war ein positiver Sprung des Stromflusses zu sehen (Abbildung 20 blau). Zuletzt wurde zu der vom Olfaktometer kondensierten PBS Lösung die kondensierte Lösung des Peptid 1 gegeben und es war ebenfalls eine deutliche positive Änderung des Stromflusses zu sehen (Abbildung 20 rot). Die Änderung des Stromflusses von der Arbeitslösung war ähnlich groß wie die der kondensierten Lösung. Da in der Lösung nur PBS mit gleicher Verdünnung, destilliertes Wasser und die Peptide vorhanden waren und die angelegte Spannung gleichblieb, sind die Peptide der einzig mögliche Faktor, der die Änderung des Stromflusses hervorrufen kann. Demnach sind sowohl in der Ausgangslösung als auch in der vom Olfaktometer kondensierten Lösung Peptide vorhanden.

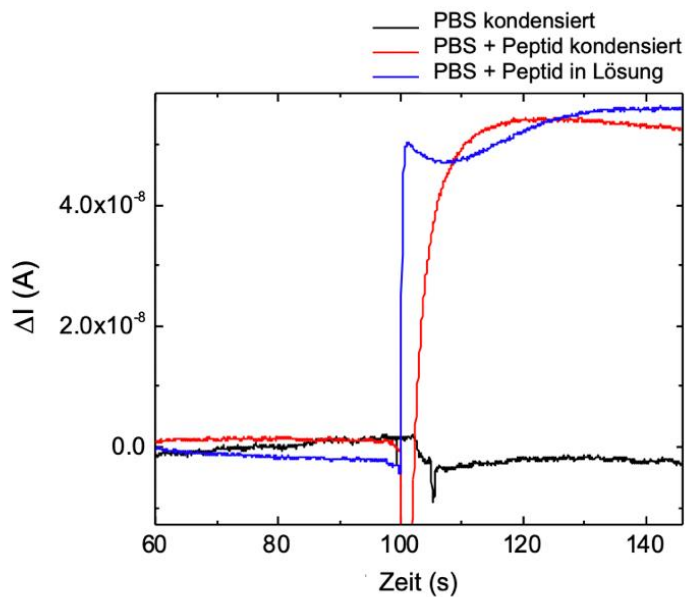


Abbildung 20: Stromdifferenzmessung (ΔI) PBS Lösung zu PBS Lösung (schwarz), PBS zu Peptid 1 in den Ausgangslösungen (blau) und PBS und Peptid 1 in den Kondensaten (rot). (erstellt von Dr. Bergoï Ibarlucea, Institut für Materialwissenschaften, Max-Liebermann-Institut in Dresden)

4.3 Psychophysische Untersuchung

In die Betrachtung der psychophysiologischen Untersuchung zur Diskrimination der Peptide im Vergleich zum PBS Puffer, der ebenfalls als Lösungsmittel für die Peptide verwendet wurde, wurden die Ergebnisse von 46 Testpersonen einbezogen, 26 davon weiblich und 20 männlich. Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten (siehe 3.4.2) und der daraus resultierenden zweiten Testreihe, bei der nicht mehr alle Probanden erreicht werden konnten, gab es 6 *Dropouts*, zwei weibliche und vier männliche.

Die Anzahl der von den Testpersonen richtig vom Puffer diskriminierten Peptiden, verteilte sich pro Peptid zwischen 1 und 10 von 10 Möglichkeiten in einer Testreihe. Dabei wurde das Peptid 1 von der Testperson im Mittel bei 4,2 ($SD \pm 1.94$) von 10 Möglichkeiten vom Puffer unterschieden, das Peptid 2 bei 4.87 ($SD \pm 2.26$) und das Peptid 3 bei 6.13 ($SD \pm 1.9$). Zur Darstellung der Verteilung der erreichten Anzahl der richtig erkannten Peptide in der Diskriminationstestung folgt Abbildung 21.

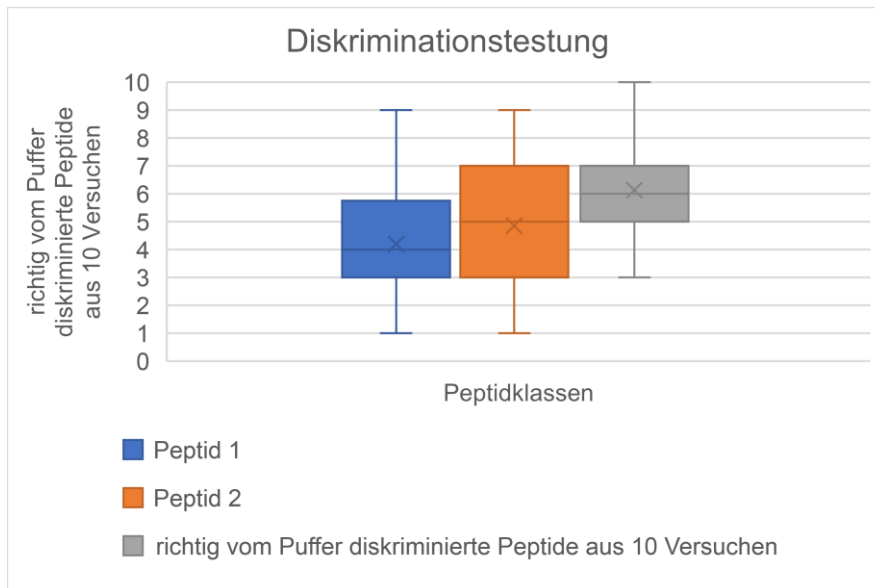


Abbildung 21: Kastengraphik Verteilung der von den Testpersonen richtig von dem als Lösungsmittel genutzten Puffers PBS diskriminierten Peptiden 1 (blau), 2 (orange) und 3 (grau) aus jeweils 10 Versuchen in der psychophysischen Diskriminationstestung.

Eine statistisch signifikante Diskrimination ($p < 0.05$) hätte vorgelegen, wenn die Testperson das Peptid bei 9 oder 10 von 10 Möglichkeiten richtig vom Puffer unterschieden hätte. Sämtliche Mittelwerte lagen unterhalb dieser Signifikanzschwelle. Peptid 1 wurde von einer Person auf dem signifikanten Niveau diskriminiert, Peptid 2 von zwei und Peptid 3 von acht. Bei diesen Testpersonen wurden die Antworten im EOG und EEG verfolgt und die Ergebnisse werden in der Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: elektrophysiologisches Antwortverhalten im EOG und EEG der Testpersonen, die Peptide signifikant diskriminiert hatten.

	Peptid 1	Peptid 2	Peptid 3
signifikant diskriminiert und positive Antwort im EOG	1/1 (1)	0/2	3/8 (0.375)
signifikant diskriminiert und positive Antwort im EEG	0/1	0/2	4/8 (0.5)

4.4 EOG

Für die Auswertung der EOGs wurden die Ergebnisse von 48 Testpersonen betrachtet von denen 26 weiblich und 22 männlich waren. In 4 Fällen war eine Messung aus technischen Gründen nicht möglich und diese Personen wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Für die Stimulation mit CO₂ wurden die Ergebnisse von 25 Testpersonen verwendet.

4.4.1 Anzahl der EOGs

Um die Häufigkeiten der EOGs beurteilen zu können, wurde das elektrophysiologische Antwortverhalten der Testpersonen auf die verschiedenen Reizklassen des Olfaktometers in

die Kategorien „typische EOG Antwort“ und „keine Antwort“ eingeteilt. Bei 46 der 48 Testpersonen konnten typische EOG Antworten gefunden werden. In die Kategorie „Artefakt“ fielen die Testpersonen, bei denen aufgrund zu vieler Artefakte zu weniger als 3 Messungen zur Mittelung zur Verfügung standen. Man konnte eine typische EOG Antwort auf den Reiz für Peptid 1 bei 27/48 (56%) der Testpersonen und für Peptid 2 bei 16/48 (34%) der Testpersonen sehen, wohingegen bei dem als Negativkontrolle strukturell veränderte Peptid 3 bei 17/48 (36%) der Testpersonen ein EOG Signal vorhanden war. Für den Puffer, in dem auch die Peptide gelöst waren, war bei 19/48 (39%) der Testpersonen ein elektrophysiologisches Signal im olfaktorischen Epithel sichtbar. Auf den olfaktorischen Kontrollreiz PEA entwickelten 25 bei 48 (53%) der Testpersonen eine typische Antwort im EOG und für den trigeminalen Kontrollreiz CO₂ 23/25 (92%) der Testpersonen. Für die genauere Verteilung des elektrophysiologischen Antwortverhaltens der Testpersonen im EOG auf die verschiedenen Reizklassen siehe Abbildung 22.

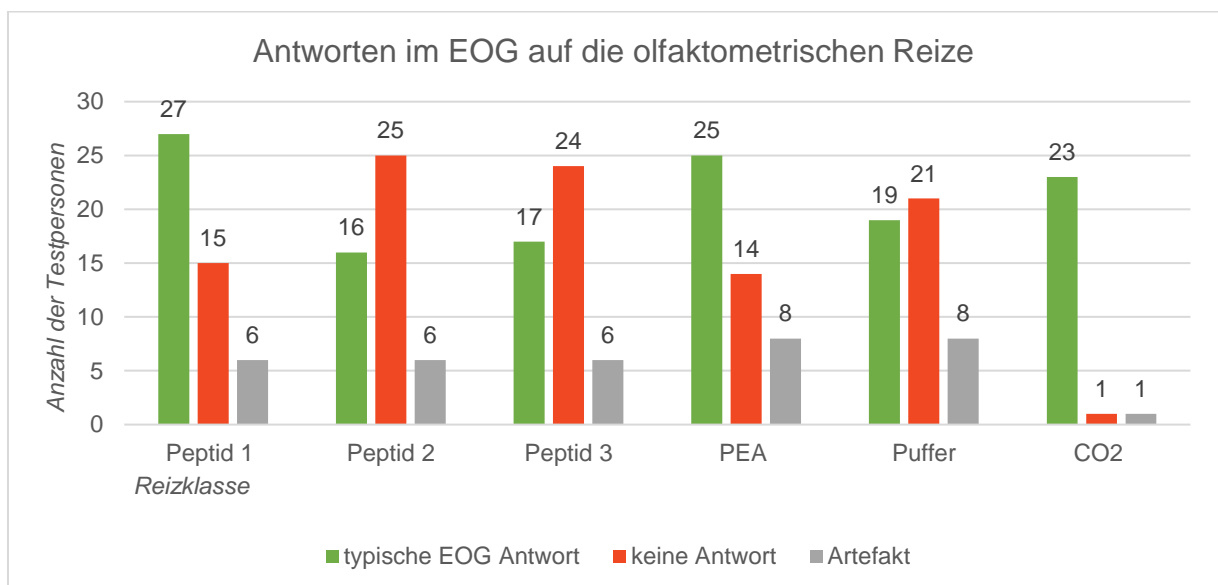


Abbildung 22: elektrophysiologisches Antwortverhalten im Elektroolfaktogramm (EOG) der Testpersonen auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1-2 und das als Negativkontrolle strukturell veränderte Peptid 3, den Puffer, die olfaktorische Kontrolle PEA (Rosenduft) und die trigeminale Kontrolle CO₂. Das Antwortverhalten wurde die drei Kategorien „typische EOG Antwort“ (grün), „keine Antwort“ (rot) und „Artefakt“ (grau), bei zu wenigen Messungen zu Mittelung, eingeteilt.

In 21/34 (61%) der Testpersonen waren Antworten im EOG für Peptid 1 und 2 zu sehen, nicht jedoch für Peptid 3. Bei 39% der Testpersonen gab es Antworten für entweder Peptid 1 oder Peptid 2 und Peptid 3. Eine Antwort nur auf eines der Peptide sah man bei 10/29 (34%) Testpersonen für Peptid 1, bei 4/19 (21%) für Peptid 2 und bei 5/18 (28%) für Peptid 3. In den EOGs sah man bei 12/34 (38%) der Testpersonen typische Antworten für Peptid 1 oder 2, nicht jedoch für den Puffer. In 3/23 Fällen (13%) gab es Antworten auf den Puffer, nicht jedoch für Peptid 1 oder 2.

In den durchgeführten Chi-Quadrat Tests zeigte sich, dass sich die Häufigkeiten der Antworten aller Klassen im EOG statistisch signifikant unterscheiden ($X^2 = 27.141, p < 0.01$). Wenn man jedoch die einzelnen Häufigkeiten der Antworten auf die Peptidreize 1, 2 und 3 mit denen auf den Puffer verglich, fanden sich im Chi-Quadrat-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Um die typischen Antworten im EOG zu charakterisieren, werden im Folgenden die Amplituden und Latenzzeiten genauer betrachtet.

4.4.2 Amplituden der EOGs

Die durchschnittliche Amplitude $|P1-N1|$ der Reizantworten im EOG betragen für die typischen Antworten auf das Peptid 1 $88.06 \mu\text{V}$ ($SD \pm 98.99$), für Peptid 2 $118.93 \mu\text{V}$ ($SD \pm 79.59$) und für das Peptid 3 $85.62 \mu\text{V}$ ($SD \pm 50.43$) und für den Puffer $72.70 \mu\text{V}$ ($SD \pm 45.10$). Auf den Kontrollreize PEA und CO_2 entwickelten die Testpersonen EOGs mit durchschnittlichen Amplituden von $85.37 \mu\text{V}$ ($SD \pm 71.65$) und von $275.97 \mu\text{V}$ ($SD \pm 191.72$). Für die genauere Verteilung der Amplituden der EOGs folgt Abbildung 23 in Form einer Kastengraphik.

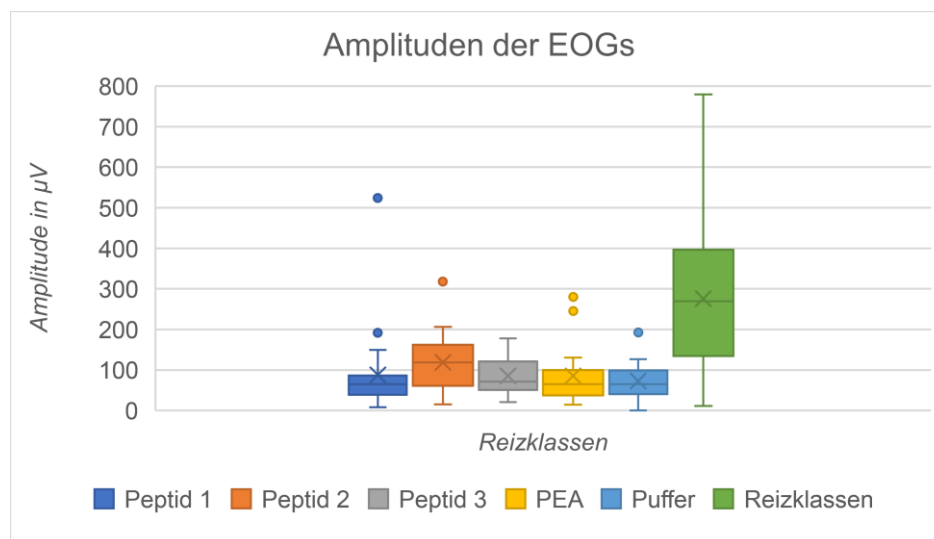


Abbildung 23: Kastengraphik Verteilung der Amplituden $|P1-N1|$ in μV der typischen Antworten im EOG auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), Peptid 4 (gelb), Puffer (hellblau), CO_2 (grün).

Die statistische Auswertung mittels t-Tests für gepaarte Stichproben ergab folgende Aussagen und Zusammenhänge. Wenn man sich alle Amplituden ohne Selektion betrachtete, ergab sich, dass die Spannungswerte für Peptid 2 im EOG signifikant größer als die unmittelbar danach gemessenen Werte für PEA ($t(9) = 2.79, p < 0.05$) waren. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen Spannungen, die durch die Peptide induziert wurden, und den durch den Puffer induzierten Werten zu finden. Es zeigte sich, dass die Amplituden von Peptid 1 mit denen zu Peptid 2, zu Peptid 3 und zum Puffer korrelierten ($r >$

0.60, $p < 0.05$) (siehe Anhang 2). Jedoch gab es keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den Spannungswerten von Peptid 1 oder Peptid 2 oder Peptid 3 mit denen von PEA.

Betrachtete man statistisch die Amplituden der Testpersonen, bei denen ein typisches EOG für PEA zu sehen war, ergab sich statistisch gesehen kein anderes Ergebnis.

4.4.3 Latenzzeiten der EOGs

Die durchschnittlichen Latenzzeiten der typischen EOG Antworten von Reizbeginn bis zum Beginn der Reizantwort, P1, betragen für Peptid 1 1050.00 ms ($SD \pm 662.11$), für Peptid 2 1399.99 ms ($SD \pm 590.04$) und für Peptid 3 1169.27 ms ($SD \pm 781.42$), für PEA 1250.00 ms ($SD \pm 689.78$), für den Puffer 1041.67 ms ($SD \pm 538.85$) und für CO₂ 1651.13 ($SD \pm 802.69$). Für die genaue Verteilung der Latenzzeitwerte der EOGs folgt die Abbildung 24 in Form einer Kastengraphik.

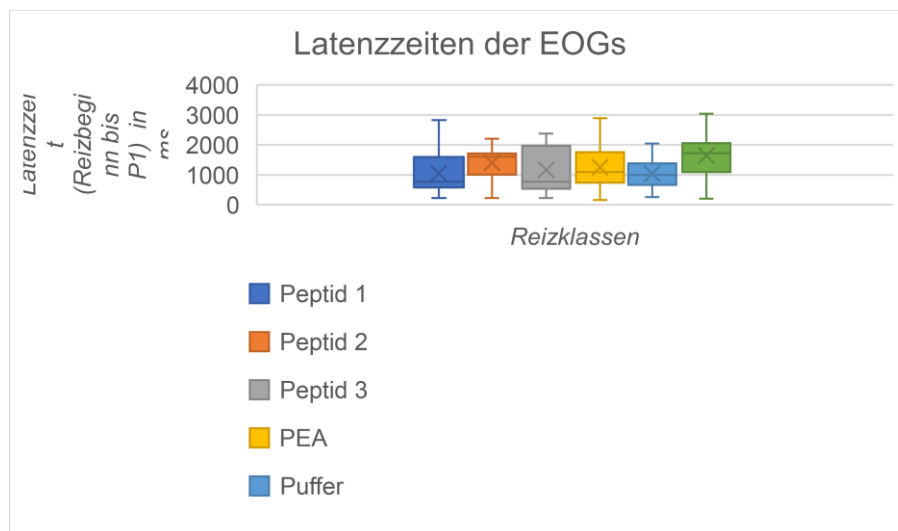


Abbildung 24: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der typischen Antworten im EOG auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün).

Im t-Test fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Latenzzeiten der EOG-Antworten auf die verschiedenen Peptide im Vergleich zum Lösungsmittel. Es ließ sich feststellen, dass die Latenzzeiten der Antworten auf Peptid 1 mit denen von Peptid 2, Peptid 3 und dem Puffer korrelierten ($r > 0.69, p < 0.05$) (siehe Anhang 3).

Betrachtete man statistisch die Latenzzeiten nur der Testpersonen, bei denen eine typische Antwort im EOG für PEA zu sehen war, ergab sich statistisch keine Korrelation der Latenzzeiten von Peptid 1 und Peptid 3.

4.4.4 Betrachtung der Ergebnisse in Bezug auf Alter und Geschlecht der Testpersonen

In Bezug auf Alter und Geschlecht der Testpersonen fanden sich nur signifikante Unterschiede für den trigeminalen Reizstoff CO₂. Frauen zeigten eine kürzere Latenzzeit von Reizbeginn bis P1 als Männer ($t(20) = 2.52, p = 0.02$). Die Amplitude $|P1-N1|$ nahm mit dem Alter ab ($r = -0.41, p < 0.05$).

4.5 CSEP im EEG

Für die Auswertung der CSEPs im EEG wurden die Ergebnisse von 50 Testpersonen, davon 27 weiblich und 23 männlich, betrachtet. Im Folgenden wird von Chemosensorisch ereigniskorrelierten Potentialen (CSEP) gesprochen, weil in dies der Überbegriff sowohl für das spezifisch olfaktorisch ereigniskorrelierte Potential (OEP) als auch für das trigeminale chemo-somatosensorisch ereigniskorrelierte Potential (CSSEP) ist (siehe 2.4.2.1) und in den Messungen beide Reizstoffklassen verwendet wurden. In 2 Fällen war eine Messung aus technischen Gründen nicht möglich und diese Testpersonen wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Für die Stimulation mit CO₂ wurden die Messungen von 26 Testpersonen verwendet.

4.5.1 Anzahl der CSEP-Antworten im EEG

Um die Häufigkeiten von CSEPs im EEG beurteilen zu können, wurde wie auch beim EOG das elektrophysiologische Antwortverhalten der Testpersonen auf die verschiedenen Reizklassen des Olfaktometers in die Kategorien „typische CSEP Antwort“ und „keine Antwort“ eingeteilt. Ebenfalls fielen in die Kategorie „Artefakt“ die Testpersonen, bei denen aufgrund zu vieler Artefakte zu weniger als 3 Messungen zur Mittelung zur Verfügung standen. Bei 46 der 50 Testpersonen konnten typische CSEP Antworten im EEG gefunden werden. Man konnte eine CSEP Antwort im EEG auf Reize mit Peptid 1 bei 23/50 (46%) der Testpersonen und mit Peptid 2 bei 23/50 (46%) der Testpersonen feststellen, wohingegen man bei dem als Negativkontrolle veränderte Peptid 3 bei 25/50 (50%) der Testpersonen eine Antwort sehen konnte. Für den Puffer wurde bei 20/50 (40%) der Testpersonen ein CSEP-Signal beobachtet. Auf den olfaktorischen Kontrollreiz PEA entwickelten 33/50 (60%) der Testpersonen eine typische OEP-Antwort im EEG und für den trigeminalen Kontrollreiz CO₂ ließen sich bei 18/26 (70%) der Testpersonen ein typisches CSSEP im EEG erkennen. Für die genaue Verteilung des elektrophysiologischen Antwortverhaltens der Testpersonen im EEG auf die verschiedenen Reizklassen des Olfaktometers siehe Abbildung 25.

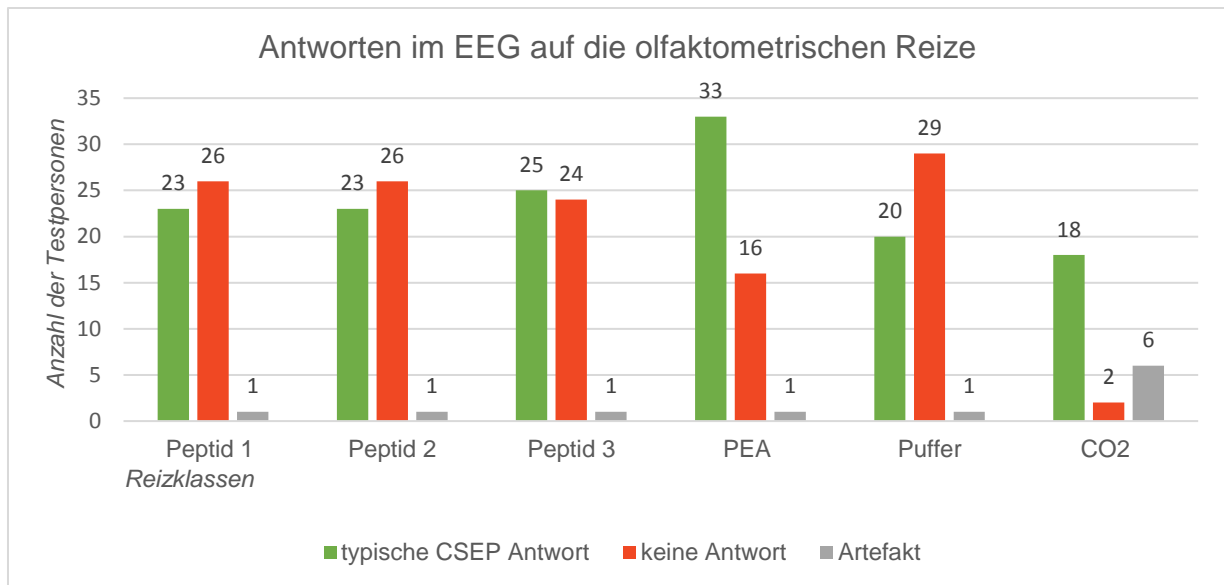


Abbildung 25: elektrophysiologisches Antwortverhalten im Elektroenzephalogramm (EEG) der Testpersonen auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 und 2, das als Negativkontrolle strukturell veränderte Peptid 3, den Puffer, die olfaktorische Kontrolle PEA (Rosenduft) und trigeminale Kontrolle CO₂. Das Antwortverhalten wurde die drei Kategorien „typische CSEP (chemosensorisch ereigniskorreliertes Potential) Antwort“ (rot), „keine Antwort“ (grün) und „Artefakt“ (grau), bei zu wenigen Messungen zu Mittelung, eingeteilt.

In den durchgeführten Chi-Quadrat Tests zeigte sich, dass sich die Häufigkeiten der OEP-Antworten aller Klassen im EEG statistisch signifikant unterscheiden ($\chi^2 = 19.477, p < 0.01$). Wenn man jedoch die einzelnen Häufigkeiten der Antworten der Peptide 1, 2 und 3 mit denen des Lösungsmittels verglich, fanden sich im Chi-Quadrat-Test wiederum keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Um die CSEP im EEG zu charakterisieren, werden im Folgenden die Amplituden und Latenzzeiten genauer betrachtet.

4.5.2 Amplituden der CSEPs

Die durchschnittlichen Amplitudenwerte |N1-P2| der CSEP im EEG sind im Anhang 4 in einer Übersicht dargestellt. Für die Verteilung der Amplitudenwerte folgt für die Elektrodenposition Pz folgt die Abbildung 26 in Form einer Kastengraphik. Die Abbildungen für die Elektrodenpositionen Cz und Fz sind im Anhang 5 und 6 zu finden.

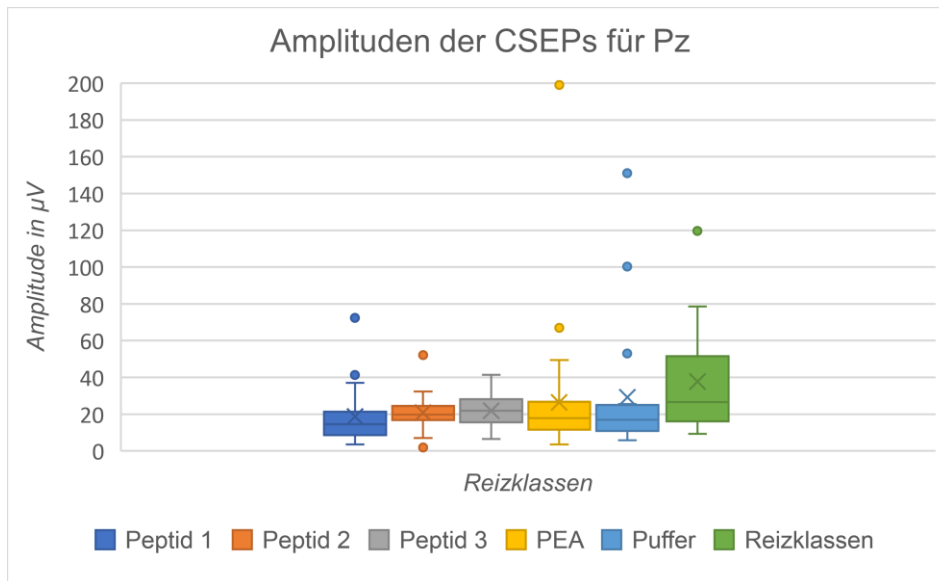


Abbildung 26: Kastengraphik Verteilung der Amplituden $[N1-P2]$ in μV der CSEPs für die Elektrodenposition Pz für die Reizklassen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau) und CO₂ (grün).

In der statischen Testung mittels t-Test für abhängige Stichproben fanden sich keine signifikanten Unterschiede für die Amplituden der CSEP Antworten auf die Peptide im Vergleich zum Lösungsmittel. Bei der Testung auf Korrelation fand sich in allen drei Ableitungen eine Korrelation zwischen der Amplitude der Antworten auf die Reize durch Peptid 1 und PEA ($r = 0.62, p < 0.01$), sowie Peptid 1 und dem Puffer ($r = 0.78, p < 0.01$).

4.5.3 Latenzzeiten der CSEPs

Die durchschnittlichen Latenzzeiten der Reizantworten im EEG vom Reizbeginn bis zu den charakteristischen Kurvenpunkten P1 zu N1, P2 (siehe 2.4.2.2) sind im Anhang 4 in einer Übersicht zu finden. Für die Verteilung der Werte der Latenzzeiten folgt für die Elektrodenposition Pz folgt die Abbildung 27 in Form einer Kastengraphik. Die Abbildungen für die Elektrodenpositionen Cz und Fz sind im Anhang 7 und 8 zu finden.

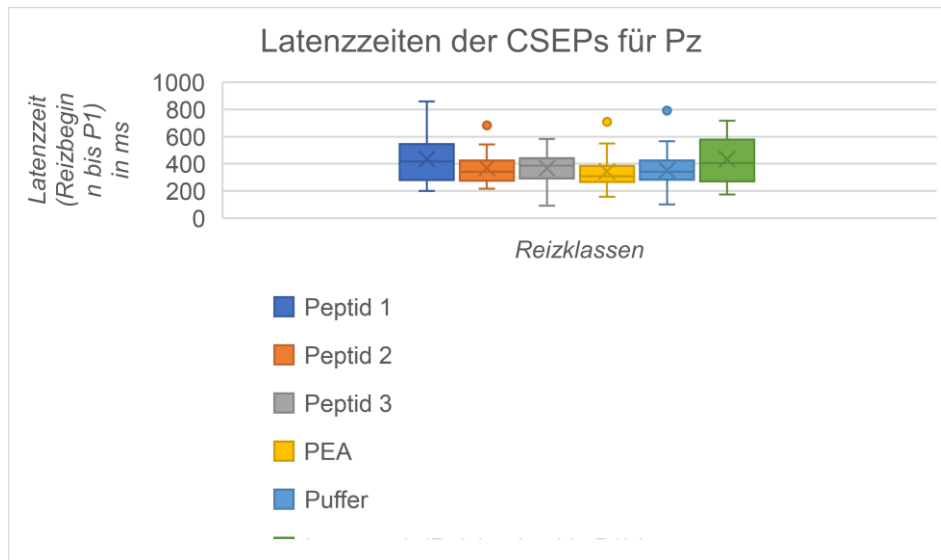


Abbildung 27: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der CSEPs im EEG für die Elektrodenposition Pz auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün).

Im t-Test fanden sich keine signifikanten Unterschiede aller Latenzzeiten der Antworten der Peptide im Vergleich zum Lösungsmittel. Es zeigte sich eine Korrelation in allen drei Ableitungen der Latenzzeit von Reizbeginn bis P1 der Antworten auf Peptid 2 und PEA ($r = 0.65, p < 0.05$).

4.5.4 Kongruenzen der Antworten in EOG und EEG

Zur Aufschlüsselung der Übereinstimmungen des elektrophysiologischen Antwortverhaltens der Testpersonen im EOG und im EEG auf die verschiedenen Reizklassen des Olfaktometers folgen zwei Tabellen.

Tabelle 4: elektrophysiologisches Antwortverhalten der Testpersonen im EEG in Bezug auf das Antwortverhalten im EOG.

	Peptid 1	Peptid 2	Peptid 3	PEA	Puffer	CO ₂
Antwort im EEG nach EOG positiv	10/27 (0.37)	8/16 (0.5)	10/17 (0.59)	20/25 (0.8)	8/19 (0.42)	15/23 (0.65)
Antwort im EEG nach EOG negativ	6/15 (0.4)	13/25 (0.52)	14/24 (0.58)	5/14 (0.36)	14/21 (0.67)	0/1
Antwort im EEG nach EOG gleich	16/42 (0.38)	21/41 (0.51)	24/41 (0.59)	25/39 (0.64)	22/40 (0.55)	15/24 (0.63)

Tabelle 5: elektrophysiologisches Antwortverhalten der Testpersonen im EOG in Bezug auf das Antwortverhalten im EEG.

	Peptid1	Peptid 2	Peptid 3	PEA	Puffer	CO ₂
Antwort im EOG nach EEG positiv	10/23 (0.43)	8/23 (0.35)	10/25 (0.4)	20/33 (0.60)	8/20 (0.4)	15/18 (0.83)
Antwort im EOG nach EEG negativ	6/26 (0.23)	13/26 (0.5)	14/24 (0.58)	5/16 (0.31)	14/29 (0.48)	0/2
Antwort im EOG nach EEG gleich	16/49 (0.33)	21/49 (0.43)	24/49 (0.49)	25/49 0.51	22/49 (0.45)	15/20 (0.75)

Auffallend hierbei ist, dass die prozentuale Übereinstimmung der positiven elektrophysiologischen Antworten für PEA bei 80% und 60% liegt und bei CO₂ bei 65% und 83%. Hingegen lagen die prozentualen Übereinstimmungswerte für die die positiven Antworten der Peptide und des Puffers alle unter 60%.

4.6 Frequenzanalyse

Bei der Auswertung der Frequenzanalyse des EOGs wurde auf die Frequenzen im Delta-Rhythmus (0.5-3 Hz) geachtet, da die Frequenzänderung des EOG-Potentials, mit einer Dauer von mehr als 4 s, in diesem Spektrum zu finden ist. Hierbei sah man das höchste Vorkommen dieser speziellen Frequenz, repräsentiert durch die Höhe der sogenannten „Frequenzbande“, für die typischen Antworten im EOG auf den PEA-Reiz (siehe Abbildung 28). Die Frequenzbande der Deltafrequenz für den Puffers war höher als die für die Peptide. Die Höhe der Frequenzbanden der Peptide unterschieden sich untereinander nicht. Die elektrophysiologischen Antworten im EOG bei olfaktometrischer Stimulation mit Peptiden zeigten demnach nicht häufiger eine Frequenzänderung in der zu Deltafrequenz als die Antworten bei Stimulation mit dem Puffer.

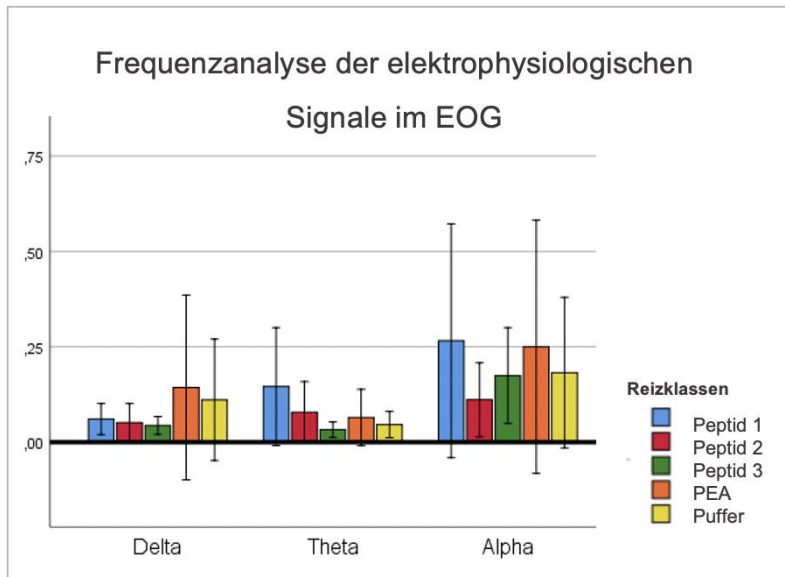


Abbildung 28: Frequenzbanden (Mittelwerte, 95% Konfidenzintervall) für die Frequenzspektren der Alpha-, Theta- und Deltafrequenz der elektrophysiologischen Antworten im EOG bei Stimulation mit den olfaktometrischen Reizen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (rot), Peptid 3 (grün), PEA (orange) und Puffer (gelb). Für die Auswertung der Signale im EOG waren die Frequenzbanden der Deltafrequenz von Bedeutung. (erstellt von Cagdas Guducu, Abteilung für Biophysik, medizinische Fakultät, Dokuz Eylul Universität, Izmir, Türkei)

Da die Frequenzänderung des OEP im EEG schneller als die des EOG vonstatten geht, mit einer Dauer von ungefähr 400 ms, wurde in der Auswertung der Frequenzanalyse des EEGs auf die Alphafrequenz (8-14 Hz) geachtet. Auch hier war die Frequenzbande für PEA am höchsten. Die Frequenzbanden der Antworten im EEG auf die Stimulation mit Peptiden und dem Lösungsmittel unterschieden sich in ihrer Höhe nicht voneinander.

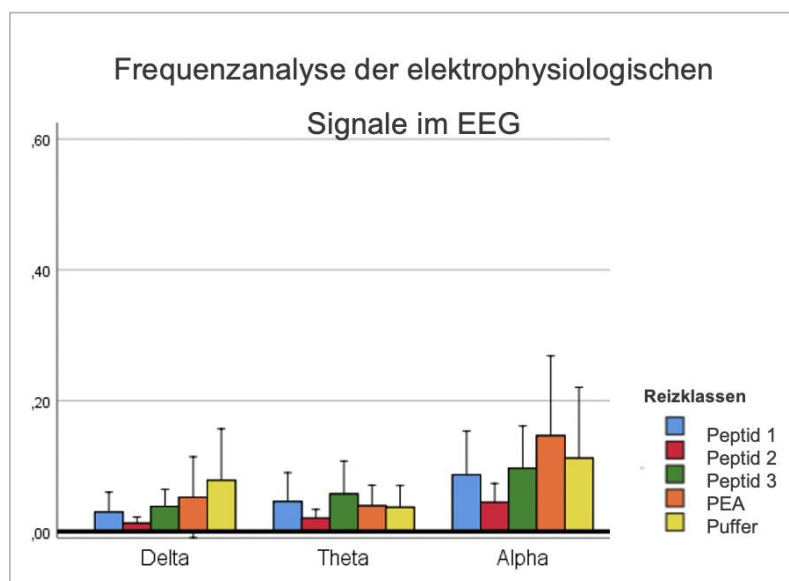


Abbildung 29: Frequenzbanden (Mittelwerte, 95% Konfidenzintervall) für die Frequenzspektren der Alpha-, Theta- und Deltafrequenz der elektrophysiologischen Antworten im EEG bei Stimulation mit den olfaktometrischen Reizen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (rot), Peptid 3 (grün), PEA (orange) und Puffer (gelb). Für die Auswertung der Signale im EEG waren die Frequenzbanden der Alphafrequenz von Bedeutung. (erstellt von Cagdas Guducu, Abteilung für Biophysik, medizinische Fakultät, Dokuz Eylul Universität, Izmir, Türkei)

4.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Peptide konnten sowohl in der Ausgangslösung als auch in der durch das Olfaktometer kondensierten Lösung vom FET nachgewiesen werden. Die Testpersonen waren in der Diskriminationstestung nicht in der Lage die Peptide vom Puffer zu unterscheiden. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigten die Messungen für CO₂, als Positiv-Referenz für die trigeminale Aktivierung, die in der Literatur als typisch beschriebenen Charakteristika für Latenzzeiten und Amplitude (Frasnelli und Hummel, 2003). Die Erfolgsrate für das Gewinnen eines EOG in Bezug auf PEA, als Positiv-Referenz für die olfaktorische Aktivierung, lag trotz korrekt platzierter Elektrode bei 53%, im EEG bei 60%, was den in der Literatur angegebenen Werten entspricht (Lötsch und Hummel, 2006; Lapid und Hummel, 2013). Die elektrophysiologisch messbaren Antworten für die Peptide 1 und 2 konnten weder in der Häufigkeit noch in der Amplitude und Latenzzeiten signifikant von denen für das Negativ-Kontrollpeptid (3) und den Puffer unterschieden werden. In der Frequenzanalyse zeigte PEA sowohl im EOG als auch im EEG die höchste Frequenzbanden, während sich die Frequenzbanden für Peptid 1 und 2 von denen für das Negativ-Kontrollpeptid (3) und den Puffer nicht unterschieden.

5 Diskussion

Basierend auf den Ergebnissen der Studie wird im folgenden Teil eine Bewertung und Interpretation dieser vorgenommen und in Zusammenhang mit der aktuellen und bisherigen Literatur gebracht.

5.1 Bewertung der Ergebnisse der Volatilitätstestung

Die Nonapeptide waren sowohl in der Ausgangslösung als auch in der kondensierten Lösung Peptide vorhanden. Das zeigt, dass Nonapeptide im Aerosol des Olfaktometers volatil sind und somit im Aerosol an das olfaktorische Epithel in der Nase gelangen können. In der Literatur lag die Molekülmasse des bisher schwersten Moleküls, das vom Menschen olfaktorisch wahrgenommen werden kann, bei 324,5 Da (Rowe, 2009; Ohloff et al., 2012). In der vorliegenden Messung dieser Dissertationsschrift hingegen konnte gezeigt werden, dass ein Molekül mit einer Molekularmasse von 954,18 Da im Aerosol volatil ist. Leinders-Zufall und Spehr hatten in ihren Versuchen an Ratten zeigen können, dass Nonpeptide mit ähnlichem Molekulargewicht Rezeptorneuronen im vomeronasalen Organ und auch im olfaktorischen Epithel aktivieren konnten (Leinders-Zufall et al., 2004; Spehr, 2006). Diese Erkenntnis bildeten die Voraussetzung für eine elektroolfaktorische Messung und die Validität der Ergebnisse.

5.2 Diskussion der Testmethoden

5.2.1 Beurteilung der Ergebnisse der Psychophysischen Untersuchung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass HLA-assoziierte Peptide nicht von Lösungsmittel unterschieden werden können. Milinski ließ die Probanden in seiner Versuchsreihe von 2013 die gleichen Peptide, wie sie auch in der Studie dieser Dissertationsschrift verwendet wurden, in einer Konzentration von 5 μM auf die eigene Haut des Unterarmes auftragen und dann daran riechen (Milinski et al., 2013). Argumentativ begründend wurde angeführt, dass die Peptide nur eine funktionelle Antwort hervorrufen, wenn sie von einem natürlichen Geruchsfaktor begleitet werden (Preti et al., 2003), wie auch in Tierstudien nachgewiesen (Milinski et al., 2010). Milinski fand in diesem Versuchsaufbau eine Präferenz für Peptide, die dem eigenen HLA-Typ entsprachen. Für die folgende MRT-Bildgebung wurde dann jedoch eine 25 μM Peptidlösung verwendet, die nicht auf die Haut aufgetragen wurde, sondern die mittels eines Olfaktometers direkt in die Nase gelangte. Dort fanden Milinski und Kollegen spezifische Aktivierungen von Gehirnregionen (Milinski et al., 2013). Dementsprechend rufen nach Milinski und Kollegen die Peptide auch eine Antwort hervor, wenn sie nicht mit einem natürlichen Duft verbunden sind.

In unserem Versuchsaufbau nutzten wir basierend auf diesen Erkenntnissen eine 25 μM -Lösung für die Diskriminationstestung, in der Annahme, dass diese Konzentration für Menschen über der Wahrnehmungsschwelle riechbar sein müsste, wenn Milinski einen spezifischen Unterschied in der Präferenz bei 5 μM finden konnte. Diese Annahme konnten wir mit unseren Ergebnissen nicht bestätigen. Den Ergebnissen der Diskriminationstestung folgend können Menschen die HLA-assoziierte Peptide in dieser Konzentration nicht von dem Puffer unterscheiden, also nicht wahrnehmen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Peptide in der vorliegenden Konzentration oder im Allgemeinen nur unterschwellig wahrgenommen werden können, demnach ein Signal unterhalb der Wahrnehmungsschwelle hervorrufen.

Zu dem Versuchsaufbau der psychophysischen Untersuchung ist anzumerken, dass die Volatilität der Peptide zwar für das Aerosol des Olfaktometers nachgewiesen wurde, nicht jedoch für verdunstende Lösung bei Raumtemperatur. Allerdings gaben die Probanden auch bei der olfaktometrischen Messung an, keinen Unterschied bei den einzelnen Peptidklassen gerochen zu haben. In der Annahme, dass die Peptide auf der Haut auch nicht in einer Umgebung der Körpertemperatur, sondern eher Raumtemperatur sind (Milinski et al., 2013), ist zufolge grundsätzlich anzunehmen, dass sie auch bei Raumtemperatur volatil sind.

5.2.2 Beurteilung der Ergebnisse der elektrophysiologischen Messungen und der Frequenzanalyse

Die Häufigkeiten der Aktivierung durch die Peptide 1 und 2 war weder im EOG noch im EEG signifikant höher als die für das Kontrollpeptid (3) und für den Puffer, wobei die Häufigkeit der Aktivierung durch das PEA und CO_2 sich signifikant davon unterschied. Es war also bei dem Großteil der Testpersonen eine typische Antwort im EOG und EEG für den Olfaktoriusteststoff und trigeminalen Reizstoff zu sehen, jedoch kein ähnlich starkes Antwortverhalten für die Peptide oder den Puffer. Auch in den typischen Charakteristika der Antworten im EOG und EEG, den Amplituden und den Latenzzeiten, war kein Unterschied zwischen den Antworten auf die Peptide 1 und 2, dem Kontrollpeptid (3) und dem Puffer vorhanden. Die elektrophysiologisch messbaren Antworten für die Peptide 1 und 2 konnten weder in Quantität noch in der Qualität von denen für das Kontrollpeptid und den Puffer unterschieden werden. Bezogen auf die trigeminale Stimulation mit CO_2 waren in den elektrophysiologischen Messungen dieser Versuchsreihe die in der Literatur als typisch beschriebenen Charakteristika zu sehen. Frauen zeigen kürzere Latenzzeiten als Männer und die Amplitude nahm mit dem Alter ab (Frasnelli und Hummel, 2003). Die Erfolgsrate für das Gewinnen eines EOG in Bezug auf PEA lag trotz korrekt platzierter Elektrode bei 53%, im EEG bei 60%, was den in der Literatur angegebenen Werten entspricht (Lötsch und Hummel, 2006; Lapid und Hummel, 2013). Weiterhin stimmten die positiven Antworten an sich im EOG und EEG für den

olfaktorischen Reizstoff PEA und den trigeminalen Reizstoff CO₂ in 60 bzw 80% der Fälle überein. Jedoch lag die Übereinstimmung der positiven Antworten bei den Peptiden und dem Puffer nur bei rund 40%. Das deutet darauf hin, dass positive Antworten auf Peptide und den Puffer im EOG und EEG eher als unspezifischer zu bewerten sind als die auf bekannte Reizstoffe. Nach den Ergebnissen der Diskriminationstestung wäre anzunehmen gewesen, dass die Peptide, wenn überhaupt, nur eine unterschwellige Stimulation bewirken, da diese nicht voneinander diskriminiert und unterschieden werden konnten. Es ist prinzipiell möglich auch bei solchen Reizen ein EOG aufzuzeichnen, die von Testpersonen nicht wahrgenommen wurden (Hummel et al., 2006). Jedoch bestätigte sich diese Annahme nicht. Auch für die Testpersonen, die die Peptide in der Diskrimination statistisch signifikant erkannt hatten, wurde keine Aktivierung im EOG oder EEG bei Stimulation mit dem gleichen Peptid gefunden. Die Frequenzanalyse, als objektives Auswertungsverfahren, unterstützte diese Beobachtung. Die Frequenzbanden der Peptide und des Puffers waren im Vergleich zu denen des bekannten olfaktorischen Reizstoff PEA wesentlich geringer und unterschieden sich nicht voneinander. Eine olfaktorische Aktivierung durch die Peptide und den Puffer konnte im Vergleich zu PEA nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Frequenzanalyse deuteten darauf hin, dass keine spezifisch olfaktorische Aktivierung durch die Peptide hervorgerufen wurde.

Zu der Testmethode der elektrophysiologischen Testung ist an dieser Stelle nochmals auf die geringe Erfolgsrate beim EOG hinzuweisen, die bedingt, dass die Methode wenig aussagekräftig bei geringer Testpersonenanzahl ist. Ebenfalls ist bedeutsam, dass die Entstehung eines EOG und eines OEP von der Konzentration des Duftes abhängig ist (Lapid et al., 2009). Basierend auf den Ergebnissen und Erkenntnissen von Milinski (Milinski et al., 2013) wurde die Konzentration der Peptidlösung von 25 µM gewählt. Natsch diskutierte ebenfalls, dass die synthetische Herstellung der Peptide einen Einfluss bezüglich ihrer Wirksamkeit haben könnte. Man wäre damit im Vorhinein davon ausgegangen, dass synthetisch hergestellte Peptide die gleichen biochemischen und behavioralen Auswirkungen hätten, wie Peptide, die aus dem Schweiß einer Testperson stammten. Nach seiner Ansicht sollten deshalb für Testungen auch zum HLA-Typ passende und nicht passende aus dem Schweiß von Menschen extrahierte Peptide genutzt werden, um eine eventuell unterschiedliche Wirkung auszuschließen (Natsch, 2014).

Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen der elektrophysiologischen Messungen zu schlussfolgern, dass kein spezifisches Signal im olfaktorischen Epithel und den verarbeitenden Strukturen im Gehirn bei Stimulation mit HLA-assoziierten Peptiden nachgewiesen werden konnte. Demnach ist auch keine unterschwellige Wahrnehmung vorhanden. Das widerspricht

insoweit früheren Ergebnisse, als dass kein spezifisches Antwortsignal auf Stimulation mit Peptiden detektiert werden konnte.

5.3 Diskussion der Ergebnisse in Bezug auf die olfaktorische Wahrnehmung von HLA-assoziierten Peptiden

Unsere Ergebnisse unterscheiden sich von den Ergebnisse von Milinski und seinem Forschungsteam (Milinski et al., 2013). Während sie eine Präferenz der Studienteilnehmer für das Peptid ihres eigenen HLA-Types in einer Konzentration von 5 μM - aufgetragen auf den Unterarm - finden konnten, waren die Testpersonen in der vorliegenden Studie nicht in der Lage, die 25 μM Lösung vom Puffer zu unterscheiden. Desweiteren fand Milinski eine spezifische Aktivierung von Gehirnaverealen bei Stimulation mit den Peptiden aus dem Olfaktometer, wobei in der vorliegenden Studie weder Unterschiede in der Häufigkeit noch in der Qualität von Antworten des olfaktorischen Epithels und ereigniskorrelierten Antworten im Gehirn bei olfaktometrischer Stimulation mit Peptiden gefunden werden konnten. Dabei hatten die Studien einen unterschiedlichen Ansatz. Milinski konzentrierte sich auf die Selbstwahrnehmung und Präferenz für HLA-assoziierte Peptide, die mit dem eigenen HLA-Typ übereinstimmten. Die vorliegende Studie basierte auf der Annahme, dass es eine universelle Wahrnehmung von Peptiden geben müsste, die durch die spezifische Struktur der Nonapeptide und deren Interaktion mit dem Rezeptor bedingt wird. Demensprechend wurden alle Studienteilnehmer auf die gleichen Peptide getestet und nicht auf die zu ihrem HLA-Typus passenden. Allerdings würde man nach einer statistischen Verteilung wie in der deutschen Bevölkerung davon ausgehen, dass 40% der Testpersonen den HLA-Typ A*0201 oder A*2402 haben müssten (Schmidt et al., 2010), zu welchen passend die Peptide ausgewählt wurden. In der Studie von Milinski und seinem Forschungsteam waren sogar 60% (21 von 32) der Probanden entweder auf einen der beiden Typen oder auf beide positiv getestet worden (Milinski et al., 2013). Demnach wären 40-60% der Testpersonen in der vorliegenden Studie auch mit selbst-Peptiden stimuliert worden. Die niedrige Kongruenz der EOG und EEG Antworten, die für die Peptide 1 und 2 sowie für das Kontrollpeptid und den Puffer bei 40% lagen, sprechen jedoch dagegen. Man würde bei einer spezifischen olfaktorischen Antwort davon ausgehen, dass diese dann zumindest bei den Peptiden 1 und 2 ähnlich hoch wie bei PEA wären oder sich zumindest statistisch signifikant von denen für das Kontrollpeptid und den Puffer unterscheiden würde.

Eine mögliche Erklärung könnte also darin liegen, dass Menschen, Milinskis Ausführungen folgend, nur selbst-Peptide wahrnehmen können (Milinski, 2001; Milinski et al., 2013). Das würde im Kehrschluss bedeuten, dass man die Peptide anderer Menschen nur wahrnehmen könnten, wenn sie den unseren gleichen. Inwiefern diese dann als anziehend oder abstoßend

gewertet werden können und wie eine Signalverarbeitung im Gehirn ablaufen könnte, wurde bisher nicht publiziert und wäre demnach rein spekulativ. Allerdings könnte dies besonders die Theorie bestärken, dass durch HLA-assoziierte Peptiderkennung Inzucht vermieden werden kann. Hat jemand ein potentiell ähnliches HLA-Muster und riecht ähnlich wie wir selbst, ist der Verwandtschaftsgrad zu nah und damit eine Paarung unerwünscht (Penn, 2002). Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass Menschen HLA-assoziierte Peptide olfaktorisch nicht wahrnehmen können. Während bei Ratten, Mäusen und Fischen eindeutig gezeigt wurde, dass HLA-Peptide durch olfaktorische Aktivierung das Sozialverhalten beeinflussten, ist die Forschungslage für den Menschen nicht eindeutig. Wedekind und seine Kollegen zeigten anhand von Testpersonen, die an T-Shirts von anderen Testpersonen rochen, dass es eine zum HLA-Typus disassortative Präferenz für einen Partner gibt (Wedekind et al., 1995). Allerdings muss dazu gesagt werden, dass nicht genau analysiert wurde, was in den T-Shirts den Geruch ausmachte. Wie in der Einleitung beschrieben, besteht der Großteil des Schweißes aus Wasser, Fettsäuren und Elektrolyten, zusätzlich beeinflusst das Mikrobiom der Haut und abgestorbenen Zellmaterial den Körpergeruch. Das Forschungsteam von Carvalho Santos konnte diese Präferenz nicht reproduzieren (Carvalho Santos et al., 2005).

Physiologisch gesehen könnte das Bindeprotein im Mukus auf der Nasenschleimhaut für Peptide fehlen, sodass sie nicht an die Rezeptoren gelangen können (Pelosi, 2001). Damit käme es zu keiner Peptid-Rezeptor Interaktion und zu keiner Aktivierung von ORN. Eventuell lagen die spezifischen Rezeptoren ursprünglich auch nur in der Region des VNO, wie zuerst angenommen und in Ratten gefunden (Leinders-Zufall et al., 2004). Das Vorhandensein eines funktionellen VNO im Menschen ist nicht als wahrscheinlich anzusehen (Witt und Hummel, 2006). Es ist zwar anatomisch möglich den Ductus vomeronalis, zumindest bei einem Anteil von Menschen, darzustellen (Knecht et al., 2001) und die Arbeitsgruppe von Monti-Bloch gelang es auch, elektrophysiologisch ein vermeintlich spezifisches Signal abzuleiten (Monti-Bloch und Grosser, 1991). Allerdings werden diese Ergebnisse kritisch beurteilt, weil es seitdem keiner Arbeitsgruppe gelang, diese Ergebnisse zu reproduzieren (Knecht et al., 2003; Hummel et al., 2011). Wenn also die Funktion eines embryonal angelegten VNO im Menschen verloren gegangen ist, könnte damit auch der Verlust der Wahrnehmung von HLA-assoziierten Peptiden einhergegangen sein.

Evolutionsbiologisch gesehen äußerte Boehm die Möglichkeit, dass HLA-Rezeptoren ursprünglich in Wirbeltieren ausschließlich die Funktion der selbst- und fremd-Erkennung zu Paarungszwecken hatten. Über die Zeit habe sich dann die gut erforschte Funktion im Immunsystem entwickelt (Boehm, 2012). Es könnte also sein, dass das HLA-System mit seinen Rezeptoren seine Funktion vollständig geändert hat. Man hat menschliche ORN ebenfalls auf

Spermien gefunden, deren Genort neben denen für die der HLA-Rezeptoren lagen. HLA-assoziierte Peptide könnten also olfaktorische Rezeptoren aktivieren. Diese lägen aber nicht in der Nase, sondern auf dem Spermium (Spehr et al., 2004). Die Assoziation eines direkten Einflusses von HLA-assoziierten Peptiden auf den Vorgang der Kohabitation und der Konzeption liegt nicht ganz fern. Die Funktion der MHC-assoziierten Peptide in Mäusen liegt unter anderem im sogenannten Bruce-Effekt (Rozenkrantz et al., 2020). Dieser beschreibt die Verhinderung der Schwangerschaft eines Weibchens wenn es fremde, nicht zum Partner passende Peptide wahrnimmt (Lloyd-Thomas und Keverne, 1982; Boehm und Zufall, 2006).

Zusammenfassend besteht die Möglichkeit, dass der Mensch ursprünglich, wie auch andere Wirbeltiere, HLA-assoziierte Peptide wahrnehmen konnte und auch sein Sozialverhalten und seine Partnerwahl davon beeinflusst wurde, er jedoch diese Fähigkeit verlor, oder dass sie evolutionsbiologisch nicht mehr wichtig genug war und sie durch andere Sinne ersetzt wurde.

5.4 Schlussfolgerungen

In diesem Experiment zeigten sich in der Diskriminationstestung keine Hinweise darauf, dass Menschen HLA-assoziierte Peptide diskriminieren können. Diese Beobachtung wurde durch die elektrophysiologischen Untersuchungen insoweit bestätigt, als dass keine Unterschiede in Qualität und Quantität der Antworten auf die Stimulation mit den Peptiden im Vergleich zu den Antworten auf das Kontrollpeptid und den Puffer vorhanden waren. Die Ergebnisse der frequenzanalytischen Auswertung unterstützen dies, da ebenfalls keine Unterschiede des elektrophysiologischen Antwortverhaltens zwischen den Peptiden und dem Puffer gefunden werden konnte.

Es kann den Ergebnissen und dem Studiendesign dieses Versuches, unter Rücksichtnahme der experimentellen Limitationen, entsprechend geschlossen werden, dass universelle - nicht explizit zum eigenen HLA-Typus passende - HLA-assoziierte Peptide kein spezifisches olfaktorisches Signal verursachen, das durch subjektive Beurteilung, im humanen olfaktorischen Epithel oder den verarbeitenden Strukturen im Gehirn nachgewiesen werden kann.

6 Ausblick

Resultierend aus den Schlussfolgerungen dieser Arbeit ergibt sich die Frage, ob HLA-assoziierte Peptide überhaupt olfaktorisch vom Menschen wahrgenommen werden können. In Zusammenschau mit den Ergebnissen Milinskis ließe sich annehmen, dass wenn überhaupt nur zum eigenen HLA-Typ passende HLA-assoziierte Peptide für weitere Versuche infrage kämen. Demnach müssten alle Testpersonen einer künftigen Studie zuerst HLA typisiert werden. Man könnte dann die Testpersonen mit den passenden HLA-Peptiden olfaktorisch mit einem Olfaktometer stimulieren und elektrophysiologische Messungen durchführen. Dabei sollten verschiedene und aufsteigende Konzentrationen der Peptide gewählt werden. Den gleichen Ansatz könnte man auch bei einer psychophysischen Testung wählen. Desweiteren sollte man, Natsch folgend, nicht nur synthetisierte Peptide verwenden, sondern ebenfalls solche, die aus dem Schweiß von Menschen gewonnen wurden. Auch diese könnte man dann passend zum HLA-Typ der Testperson anwenden.

Die Resultate dieser Studie weisen in der kontroversen Debatte um die olfaktorische Wahrnehmung von HLA-assoziierten Peptide im Menschen eher in die Richtung, dass es möglicherweise solch eine Wahrnehmung nicht gibt. Allerdings schließt das nicht aus, dass der HLA-Typ insgesamt den Körpergeruch, beispielsweise über das Mikrobiom der Haut verändert, wodurch der HLA-Typ indirekt einen Einfluss auf den Körpergeruch hätte. Außerdem wäre es möglich, dass es trotzdem eine gewisse Präferenz für bestimmte HLA-Merkmale in der Partnerwahl gibt, die jedoch nicht über den olfaktorischen Sinn, sondern indirekt über andere Merkmale wie dem Aussehen vermittelt wird. Die Frage inwiefern der HLA-Typ des Gegenübers erkannt werden kann und welche Funktion solche Präferenzen haben, bleibt und erfordert weitere Forschung.

7 Zusammenfassung

Bei vielen Säugetieren wird die soziale Kommunikation und Partnerwahl durch olfaktorische Botenstoffe codiert durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) beeinflusst. Analog dazu wird auch beim Menschen angenommen, dass Peptide, die mit dem humanen Leukozytenantigen (HLA) assoziiert sind, einen Einfluss auf den Körpergeruch und die Attraktivität eines möglichen Partners haben. Das HLA System ist ein wichtiger Teil des erworbenen Immunsystems und bildet das Pendant zum MHC im Menschen. Insbesondere scheint es eine Präferenz für einen zu dem eigenen unähnlichen, disassortative, HLA-Typen zu geben. Das Ziel dieser Arbeit war, herauszufinden, ob beim Menschen HLA-assoziierte Peptide als volatile Duftstoffe in der Nasenschleimhaut olfaktorische Rezeptoren aktivieren und diese wahrgenommen können.

52 gesunde normosmische Testpersonen, davon 24 männlich und 28 weiblich, im Alter von 20-33 Jahren nahmen an der Studie teil. Es wurden 25 μM -Lösungen von 3 verschiedene Nonapeptiden in 1% Phosphat-Puffer (PBS) verwendet, von denen das 3. Peptid strukturell einer Negativkontrolle entsprach. Um die Volatilität der Peptide im Aerosol zu testen, wurden die Peptid-Lösungen - vor und nach der Kondensierung durch das Olfaktometer - durch einen Feld Effekt Transistor (FET) untersucht. Mittels Drei-Gläser-Probe wurde getestet, ob die Testpersonen die Peptide von dem Puffer unterscheiden konnten. In den elektrophysiologischen Testverfahren wurden Elektroolfaktogramme (EOG) vom olfaktorischen Epithel und olfaktorisch evozierten Potentiale (OEP) im synchron aufgezeichneten Elektroenzephalogramm (EEG) während der olfaktometrischen Stimulation abgeleitet. Außer den 3 Peptiden und dem PBS-Puffer, wurden als Kontrolle der olfaktorische Duftstoff Rose (PEA) und der trigeminale Reizstoffe CO_2 im Olfaktometer eingesetzt.

Die Peptide konnten durch den FET sowohl in der Ausgangslösung als auch in der durch das Olfaktometer kondensierten Lösung nachgewiesen werden, was die Volatilität der Peptide bestätigte. Die Testpersonen waren nicht in der Lage, die Peptide vom Lösungsmittel zu diskriminieren. In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigten die Messungen für CO_2 die für trigeminale Aktivierung typischen Charakteristika der Amplituden und Latenzzeiten. Die Erfolgsrate für das Aufzeichnen eines EOG in Bezug auf PEA lag trotz endoskopisch korrekt platzierter Elektrode bei 53% was ebenfalls den in der Literatur angegebenen Werten entspricht. Die elektrophysiologisch messbaren Antworten für die Peptide 1 und 2 konnten weder in der Häufigkeit noch in ihren Charakteristika, den Amplituden und den Latenzzeiten, noch in der Frequenzanalyse signifikant von denen für das Negativ-Kontrollpeptid (3) und dem Puffer unterschieden werden.

Es kann den Ergebnissen und dem Studiendesign dieses Versuches, unter Berücksichtigung der experimentellen Limitationen, entsprechend geschlossen werden, dass - nicht explizit zum eigenen HLA-Typus passende - HLA-assoziierte Peptide kein spezifisches Signal

verursachen, das durch subjektive Beurteilung oder am humanen olfaktorischen Epithel oder in den Gehirnreaktionen nachgewiesen werden kann.

8 Summary

In many species, social communication and mate choice are influenced by olfactory cues encoded by the major histocompatibility complex (MHC). In humans human leucocyte-antigene (HLA) associated peptides are also considered to have an influence on body odor and attractiveness of a possible partner. The HLA system is an essential part of the human adaptive immunosystem and the human pendant to MHC. It seems that humans have a preference for individuals with an unsimilar, disassortative, HLA-type compared to their own. The aim of this study was to investigate whether HLA-associated peptides as volatile odor cues bind to receptors in the human olfactory epithelium and can be recognized by humans.

In this study 52 healthy, normal normosmic volunteers, 24 males and 28 females (age of 20-33) were included. For the experimental setup 25 μ M-solutions of 3 different nonapeptides in 1% phosphate buffered saline (PBS) were used out of which the third was structurally designed as negative control. A field effect transistor (FET) was used for analyzing the peptide-solutions before and after condensation to test the volatility of the peptide in aerosol. Based on a 3 alternative-forced choice method the ability of discriminating the peptides from the PBS-solution was tested. Afterwards, during olfactory stimulation with an olfactometer, electroolfactograms (EOG) of the olfactory epithelium and olfactory event related potentials (OEP) in the electroencephalogram (EEG) were recorded as electrophysiological measurements. Apart from the 3 peptides and the PBS buffer, the scent of rose (PEA) as olfactory stimulus and CO₂ as trigeminal stimulus were used as control.

The FET revealed the same characteristics for the original and condensed peptide-solution showing that peptides were volatile. The volunteers were not able to discriminate the peptides from the PBS-solution. In the recorded electrophysiological signals typical characteristics for amplitudes and latencies could be shown due to trigeminal activation through CO₂. Furthermore, the results for obtaining an EOG due to olfactory stimulation with PEA was around 53%, in spite of having placed the electrode endoscopically correct at the olfactory epithelium, which coincides with results of similar setups in literature. It was not possible to distinguish between the electrophysiological answers to peptides 1 and 2 in comparison to negative-control peptide 3 and PBS solution in regard to prevalence, signal characteristics as amplitude levels and latencies, as well as in frequency analysis.

Within the current setup and taking into account the experimental limitations, the results suggest that HLA-associated peptides - which do not match explicitly with the own HLA-type - do not produce a significant specific olfactory activation which can be detected at the levels of subjective ratings, olfactory epithelium or brain.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung des olfaktorischen Epithels (grün) von der Riechspalte bis auf die obere und mittlere Nasenmuschel (NM), (modifiziert nach Lapid und Hummel, 2013 adaptiert von Leopold et al., 2000)	5
Abbildung 2: Aufbau des olfaktorischen Epithels mit ORN (Sinneszellen), Basalzellen und Stützzellen (modifiziert nach Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012).....	5
Abbildung 3: schematischer Ablauf der Vorgänge in einem ORN bei Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Signalkaskade durch Bindung eines Duftstoffmoleküls an ein Rezeptorprotein. (AP=Aktionspotential, ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = zyklisch Adenosinmonophosphat, G_{olf} = olfaktorisches G-Protein) (modifiziert nach Witt und Hansen, 2008).	6
Abbildung 4: schematische Darstellung der Riechbahnen.....	7
Abbildung 5: schematische Darstellung des Chromosom 6 mit kurzem Arm, auf dem die genetisch codierenden Regionen für die HLA-Proteine liegen. In der klassischen HLA-Region (dunkelblau) finden sich von Zentromer nach Telomer gelegen die Klasse-II-Region, gefolgt von der Klasse-III und Klasse-I. In der extended HLA-Region (orange) finden sich weitere mit dem HLA-System in Bezug stehende Genregionen, die unter anderem auch für olfaktorische Rezeptoren (Olf.) und Rezeptoren des vomeronasalen Organes (VNO)(modifiziert nach Fischer und Mayr, 2011).	9
Abbildung 6: Struktur von HLA-Klasse-I und -II-Molekülen. Sie ragen mit einem zytoplasmatischen Schwanzbereich in das Zytosol und sind durch transmembranöse Domänen (TD) in der Zellmembran verankert. Der extrazelluläre Domänenbereich besteht bei dem Klasse-I-Molekül aus den 3 Teilen der α -Kette, die mit ihren Domänen α_1 und α_2 die PBR bildet, und dem β_2 -Mikroglobulin. Analog dazu wird der extrazelluläre Domänenbereich der Klasse-II-Moleküle von zwei Teilen der α - und β -Kette gebildet. Die PBR wird hier von der α_1 und β_1 -Domäne bestimmt. (modifiziert nach Klein und Sato, 2000).....	10
Abbildung 7: intrazelluläre Synthesewege der HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Peptidkomplexe (modifiziert nach Klein und Sato, 2000)	12
Abbildung 8: Beispiel zur Nomenklatur eines HLA-Klasse-I-Allels, in grün unterlegt die für die Klinik und auch für diese Arbeit relevante Form.	13
Abbildung 9: Konversion eines MHC-gebundenen Peptides zu einem olfaktorisch wahrnehmbaren Molekül; (1) die PBR eines MHC-Moleküls ist mit einem Peptid mit variabler Länge, aber definierter Anker-Struktur besetzt. (2) das MHC Molekül wird proteolytisch abgebaut, was die PBR strukturell ändert und das Peptid freisetzt. (3) das Peptid kann an andere Rezeptoren wie die ORN binden (modifiziert nach Boehm und Zufall, 2006)	14
Abbildung 10: Typische Antwort im EOG auf einen Duftreiz (entnommen aus Knecht und Hummel, 2004).....	17
Abbildung 11: schematische Darstellung der Volatilitätstestung. Die Arbeitslösungen des Peptides und des Phosphatpuffers (PBS) wurden in das Olfaktometer eingefüllt, dort in Aerosol umgewandelt und es wurde aus dem Olfaktometer die kondensierten Lösungen des Peptides und des PBS gewonnen. Durch den Feld Effekt Transistor (FET) wurden sowohl die Arbeitslösungen und die kondensierten Lösungen analysiert und deren Zusammensetzungen	

<p>miteinander verglichen. Wenn die Peptide im Aerosol des Olfaktometers volatil wären, müssten sie sowohl in der Arbeitslösung als auch in der kondensierten Lösung nachzuweisen sein.</p> <p>Abbildung 12: "Sniffin Sticks", mit Duftstoffen gefüllte Stifte, die von den Testpersonen zu den Gerüchen der passenden Abbildungen zugeordnet werden sollen.....</p> <p>Abbildung 13: schematische Darstellung und Fotodokumentation einer Nasenelektrode.....</p> <p>Abbildung 14: Chlorierungsvorgang an der Silberelektrode.....</p> <p>Abbildung 15: schematisches Prinzip des Olfaktometers. Im Interstimulusintervall fließt die geruchslose Kontrollluft zum Nasenstück während das Duftgasgemisch (Duftstoff und Verdünnungsluft) von einem Vakuum abgesaugt wird. Jedoch bei der Stimulation wird die Kontrollluft von dem Vakuum abgesaugt, während das Duftgasgemisch in das Nasenstück geleitet wird. Dabei sind die Luftströme der Kontrollluft und des Duftgasgemisches gleich. (modifiziert nach Kobal und Hummel, 2001)</p> <p>Abbildung 16: Olfaktometer mit Computer.</p> <p>Abbildung 17: schematischer Versuchsablauf. Die Reize wurden mit einer Latenzzeit von 500 ms für eine Reizdauer von 500 ms appliziert, Gesamtzeit des Reizes also 1s. Danach folgte immer ein Interstimulusintervall (ISI). Zunächst wurde 4-mal CO₂, danach 10-mal PEA und dann 32-mal in randomisierter Reihenfolge die Peptidlösungen 1-3 (Pep) und die Pufferlösung (Puf).</p> <p>Abbildung 18: beispielhafte Markierung eines EOG für die Auswertung. Die Spannung wird mit dem negativen Pol nach oben angegeben.</p> <p>Abbildung 19 beispielhafte Markierung eines OEP für die Auswertung. Die Spannung wird mit dem negativen Pol nach oben angegeben.</p> <p>Abbildung 20: Stromdifferenzmessung (ΔI) PBS Lösung zu PBS Lösung (schwarz), PBS zu Peptid 1 in den Ausgangslösungen (blau) und PBS und Peptid 1 in den Kondensaten (rot). (erstellt von Dr. Bergoi Ibarlucea, Institut für Materialwissenschaften, Max-Liebermann-Institut in Dresden)</p> <p>Abbildung 21: Kastengraphik Verteilung der von den Testpersonen richtig von dem als Lösungsmittel genutzten Puffers PBS diskriminierten Peptiden 1 (blau), 2 (orange) und 3 (grau) aus jeweils 10 Versuchen in der psychophysischen Diskriminationstestung.....</p> <p>Abbildung 22: elektrophysiologisches Antwortverhalten im Elektroolfaktogramm (EOG) der Testpersonen auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1-2 und das als Negativkontrolle strukturell veränderte Peptid 3, den Puffer, die olfaktorische Kontrolle PEA (Rosenduft) und die trigeminale Kontrolle CO₂. Das Antwortverhalten wurde die drei Kategorien „typische EOG Antwort“ (grün), „keine Antwort“ (rot) und „Artefakt“ (grau), bei zu wenigen Messungen zu Mittelung, eingeteilt.....</p> <p>Abbildung 23: Kastengraphik Verteilung der Amplituden P1-N1 in μV der typischen Antworten im EOG auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1(blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), Peptid 4 (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün).....</p> <p>Abbildung 24: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der typischen Antworten im EOG auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1(blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün).....</p>	<p>23</p> <p>24</p> <p>27</p> <p>27</p> <p>28</p> <p>29</p> <p>30</p> <p>31</p> <p>31</p> <p>34</p> <p>35</p> <p>36</p> <p>37</p> <p>38</p>
---	---

- Abbildung 25: elektrophysiologisches Antwortverhalten im Elektroenzephalogramm (EEG) der Testpersonen auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 und 2, das als Negativkontrolle strukturell veränderte Peptid 3, den Puffer, die olfaktorische Kontrolle PEA (Rosenduft) und trigeminale Kontrolle CO₂. Das Antwortverhalten wurde die drei Kategorien „typische CSEP (chemosensorisch ereigniskorreliertes Potential) Antwort“ (rot), „keine Antwort“ (grün) und „Artefakt“ (grau), bei zu wenigen Messungen zu Mittelung, eingeteilt. 40
- Abbildung 26: Kastengraphik Verteilung der Amplituden |N1-P2| in µV der CSEPs für die Elektrodenposition Pz für die Reizklassen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau) und CO₂ (grün)..... 41
- Abbildung 27: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der CSEPs im EEG für die Elektrodenposition Pz auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün). 42
- Abbildung 28: Frequenzbanden (Mittelwerte, 95% Konfidenzintervall) für die Frequenzspektren der Alpha-, Theta- und Deltafrequenz der elektrophysiologischen Antworten im EOG bei Stimulation mit den olfaktometrischen Reizen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (rot), Peptid 3 (grün), PEA (orange) und Puffer (gelb). Für die Auswertung der Signale im EOG waren die Frequenzbanden der Deltafrequenz von Bedeutung. (erstellt von Cagdas Guducu, Abteilung für Biophysik, medizinische Fakultät, Dokuz Eylul Universität, Izmir, Türkei) 44
- Abbildung 29: Frequenzbanden (Mittelwerte, 95% Konfidenzintervall) für die Frequenzspektren der Alpha-, Theta- und Deltafrequenz der elektrophysiologischen Antworten im EEG bei Stimulation mit den olfaktometrischen Reizen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (rot), Peptid 3 (grün), PEA (orange) und Puffer (gelb). Für die Auswertung der Signale im EEG waren die Frequenzbanden der Alphafrequenz von Bedeutung. (erstellt von Cagdas Guducu, Abteilung für Biophysik, medizinische Fakultät, Dokuz Eylul Universität, Izmir, Türkei) 44

10 Abkürzungsverzeichnis

<i>AON</i>	–	<i>Nucleus olfactorius anterior</i>
<i>CSEP</i>	–	<i>chemosensorisch ereigniskorreliertes Potential</i>
<i>CSSEP</i>	–	<i>chemo-somatosensorisch ereigniskorrelierte Potential</i>
<i>EEG</i>	–	<i>Elektroenzephalogramm</i>
<i>EOG</i>	–	<i>Elektroolfaktogramm</i>
<i>ER</i>	–	<i>endoplasmatisches Retikulum</i>
<i>FET</i>	–	<i>Feld Effekt Transistor</i>
<i>HLA</i>	–	<i>humanes Leukozytenantigen</i>
<i>ISI</i>	–	<i>Interstimulusintervall</i>
<i>I-Wert</i>	–	<i>Identifikationswert</i>
<i>MHC</i>	–	<i>Haupthistokompatibilitäskomplex (major histokompatibility complex)</i>
<i>NMP</i>	–	<i>negatives Mukosa Potential</i>
<i>OEP</i>	–	<i>olfaktorisch ereigniskorreliertes Potential</i>
<i>ORN</i>	–	<i>olfaktorische Rezeptor Neuronen</i>
<i>PEA</i>	–	<i>Phenylethylalkohol</i>
<i>PBR</i>	–	<i>peptidbindende Region</i>
<i>VNO</i>	–	<i>Vomeronasales Organ</i>

11 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Peptide, Sequenz in single letter code</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 2: Mittelwerte für das Alter der Testpersonen und die erreichte Punktzahl im Geruchsidentifikationstest (I-Wert).</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 3: elektrophysiologisches Antwortverhalten im EOG und EEG der Testpersonen, die Peptide signifikant diskriminiert hatten.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 4: elektrophysiologisches Antwortverhalten der Testpersonen im EEG in Bezug auf das Antwortverhalten im EOG.</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 5: elektrophysiologisches Antwortverhalten der Testpersonen im EOG in Bezug auf das Antwortverhalten im EEG.</i>	<i>43</i>

12 Literaturverzeichnis

- Allison T, Goff WR. 1967. Human cerebral evoked responses to odorous stimuli. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 23(6):558–560 DOI: 10.1016/0013-4694(67)90022-3.
- Boehm T. 2012. Evolution of Vertebrate Immunity. *Curr Biol*, 22(17):R722–R732 DOI: 10.1016/j.cub.2012.07.003.
- Boehm T, Zufall F. 2006. MHC peptides and the sensory evaluation of genotype. *Trends Neurosci*, 29(2):100–107 DOI: 10.1016/j.tins.2005.11.006.
- Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell*, 65(1):175–187 DOI: 10.1016/0092-8674(91)90418-x.
- Carvalho Santos P, Augustoschinemann J, Gabardo J, Dagracobicalho M. 2005. New evidence that the MHC influences odor perception in humans: a study with 58 Southern Brazilian students. *Horm Behav*, 47(4):384–388 DOI: 10.1016/j.yhbeh.2004.11.005.
- Chen K-I, Li B-R, Chen Y-T. 2011. Silicon nanowire field-effect transistor-based biosensors for biomedical diagnosis and cellular recording investigation. *Nano Today*, 6(2):131–154 DOI: 10.1016/j.nantod.2011.02.001.
- Cui L, Evans WJ. 1997. Olfactory event-related potentials to amyl acetate in congenital anosmia. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 102(4):303–306 DOI: 10.1016/s0013-4694(96)96109-x.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtas S, van Roon-Mom WMC, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RLM, Eriksson PS. 2007. Human Neuroblasts Migrate to the Olfactory Bulb via a Lateral Ventricular Extension. *Science*, 315(5816):1243–1249 DOI: 10.1126/science.1136281.
- Dausset J. 1958. Iso-leuco-anticorps. *Acta Haematol*, 20(1–4):156–166 DOI: 10.1159/000205478.
- Evans WJ, Kobal G, Lorig TS, Prah JD. 1993. Suggestions for collection and reporting of chemosensory (olfactory) event-related potentials. *Chem Senses*, 18(6):751–756 DOI: 10.1093/chemse/18.6.751.
- Falk K, Röttschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, 351(6324):290–296 DOI: 10.1038/351290a0.
- Finkenzeller P. 1966. Gemittelte EEG-Potentiale bei olfactorischer Reizung. *Pflügers Arch Exp Gesamte Physiol Menschen Tiere*, 292(1):76–80 DOI: 10.1007/BF00413126.
- Firestein S. 2001. How the olfactory system makes sense of scents. *Nature*, 413(6852):211–218 DOI: 10.1038/35093026.
- Firestein S, Darrow B, Shepherd GM. 1991. Activation of the sensory current in salamander olfactory receptor neurons depends on a G protein-mediated cAMP second messenger system. *Neuron*, 6(5):825–835 DOI: 10.1016/0896-6273(91)90178-3.
- Fischer GF, Mayr WR. 2011. Das HLA-System. In: Kiefel V, Mueller-Eckhardt C (Hrsg) *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie: Grundlagen – Therapie – Methodik*. Springer Berlin

- Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 189–203 DOI: 10.1007/978-3-642-12765-6_14.
- Frasnelli J, Hummel T. 2003. Age-related decline of intranasal trigeminal sensitivity: is it a peripheral event? *Brain Res*, 987(2):201–206 DOI: 10.1016/S0006-8993(03)03336-5.
- Gesteland RC. 1964. Initial events of the electro-olfactogram. *Ann N Y Acad Sci*, 116:440–447 DOI: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb45073.x.
- Gesteland RC, Lettvin JY, Pitts WH. 1965. Chemical transmission in the nose of the frog. *J Physiol*, 181(3):525–559 DOI: 10.1113/jphysiol.1965.sp007781.
- Getchell TV. 1974. Electrogenic sources of slow voltage transients recorded from frog olfactory epithelium. *J Neurophysiol*, 37(6):1115–1130 DOI: 10.1152/jn.1974.37.6.1115.
- Giorgi D. 2000. Characterization of Nonfunctional V1R-like Pheromone Receptor Sequences in Human. *Genome Res*, 10(12):1979–1985 DOI: 10.1101/gr.10.12.1979.
- Graziadei PPC, Metcalf JF. 1971. Autoradiographic and ultrastructural observations on the frog's olfactory mucosa. *Z F Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 116(3):305–318 DOI: 10.1007/BF00330630.
- Graziadei PPC, Monti Graziadei AG. 1983. Regeneration in the olfactory system of vertebrates. *Am J Otolaryngol*, 4(4):228–233 DOI: 10.1016/S0196-0709(83)80063-5.
- Groyecka A, Pisanski K, Sorokowska A, Havlíček J, Karwowski M, Puts D, Roberts SC, Sorokowski P. 2017. Attractiveness Is Multimodal: Beauty Is Also in the Nose and Ear of the Beholder. *Front Psychol*, 8:778 DOI: 10.3389/fpsyg.2017.00778.
- Hari R, Portin K, Kettenmann B, Jousmäki V, Kopal G. 1997. Right-hemisphere preponderance of responses to painful CO₂ stimulation of the human nasal mucosa. *Pain*, 72(1–2):145–151 DOI: 10.1016/s0304-3959(97)00023-7.
- Hatt H. 2006. Geruch. In: Schmidt RF, Schaible H-G, Birbaumer N-P (Hrsg) *Neuro- und Sinnesphysiologie*. Springer Medizin, Heidelberg (Springer-Lehrbuch), S. 340–351.
- Horton R, Wilming L, Rand V, Lovering RC, Bruford EA, Khodiyar VK, Lush MJ, Povey S, Talbot CC, Wright MW, Wain HM, Trowsdale J, Ziegler A, Beck S. 2004. Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet*, 5(12):889–899 DOI: 10.1038/nrg1489.
- Hummel T. 2000. Assessment of intranasal trigeminal function. *Int J Psychophysiol*, 36(2):147–155 DOI: 10.1016/S0167-8760(99)00108-7.
- Hummel T, Klimek L, Welge-Lüssen A, Wolfensberger G, Gudziol H, Renner B, Kopal G. 2000. Chemosensorisch evozierte Potentiale zur klinischen Diagnostik von Riechstörungen. *HNO*, 48(6):481–485 DOI: 10.1007/s001060050602.
- Hummel T, Knecht M, Kopal G. 1996. Peripherally obtained electrophysiological responses to olfactory stimulation in man: electro-olfactograms exhibit a smaller degree of desensitization compared with subjective intensity estimates. *Brain Res*, 717(1–2):160–164 DOI: 10.1016/0006-8993(96)00094-7.
- Hummel T, Kopal G, Gudziol H, Mackay-Sim A. 2007. Normative data for the “Sniffin’ Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 264(3):237–243 DOI:

10.1007/s00405-006-0173-0.

Hummel T, Mojet J, Kobal G. 2006. Electro-olfactograms are present when odorous stimuli have not been perceived. *Neurosci Lett*, 397(3):224–228 DOI: 10.1016/j.neulet.2005.12.048.

Hummel T, Pietsch H, Kobal G. 1991. Kallmann's syndrome and chemosensory evoked potentials. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 248(5) DOI: 10.1007/BF00176762.

Hummel T, Schultz S, Witt M, Hatt H. 2011. Electrical responses to chemosensory stimulation recorded from the vomeronasal duct and the respiratory epithelium in humans. *Int J Psychophysiol Off J Int Organ Psychophysiol*, 81(2):116–120 DOI: 10.1016/j.ijpsycho.2011.05.002.

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 DOI: 10.1093/chemse/22.1.39.

Huttunen J, Kobal G, Kaukoranta E, Hari R. 1986. Cortical responses to painful CO₂ stimulation of nasal mucosa; a magnetoencephalographic study in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 64(4):347–349 DOI: 10.1016/0013-4694(86)90159-8.

Ibarlucea B, Rim T, Baek CK, de Visser JAGM, Baraban L, Cuniberti G. 2017. Nanowire sensors monitor bacterial growth kinetics and response to antibiotics. *Lab Chip*, 17(24):4283–4293 DOI: 10.1039/C7LC00807D.

Kettenmann B, Hummel C, Stefan H, Kobal G. 1997. Multiple Olfactory Activity in the Human Neocortex Identified by Magnetic Source Imaging. *Chem Senses*, 22(5):493–502 DOI: 10.1093/chemse/22.5.493.

Klein J, Sato A. 2000. The HLA system. First of two parts. *N Engl J Med*, 343(10):702–709 DOI: 10.1056/NEJM200009073431006.

Klein J, Takahata N, Ayala FJ. 1993. MHC Polymorphism and Human Origins. *Sci Am*, 269(6):78–83 DOI: 10.1038/scientificamerican1293-78.

Klem GH, Lüders HO, Jasper HH, Elger C. 1999. The ten-twenty electrode system of the International Federation. *The International Federation of Clinical Neurophysiology. Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl*, 52:3–6.

Knecht M, Hummel T. 2004. Recording of the human electro-olfactogram. *Physiol Behav*, 83(1):13–19 DOI: 10.1016/S0031-9384(04)00344-0.

Knecht M, Kühnau D, Hüttenbrink K-B, Witt M, Hummel T. 2001. Frequency and Localization of the Putative Vomeronasal Organ in Humans in Relation to Age and Gender: Frequency and Localization of the Putative Vomeronasal Organ in Humans in Relation to Age and Gender. *The Laryngoscope*, 111(3):448–452 DOI: 10.1097/00005537-200103000-00013.

Knecht M, Witt M, Abolmaali N, Hüttenbrink KB, Hummel T. 2003. Das vomeronasale Organ des Menschen. *Nervenarzt*, 74(10):858–862 DOI: 10.1007/s00115-003-1573-7.

Kobal G. 1981. *Elektrophysiologische Untersuchungen des menschlichen Geruchssinns*. Thieme, Stuttgart ; New York (Thieme-Copythek).

- Kobal G, Hummel C. 1988. Cerebral chemosensory evoked potentials elicited by chemical stimulation of the human olfactory and respiratory nasal mucosa. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 71(4):241–250 DOI: 10.1016/0168-5597(88)90023-8.
- Kobal G, Hummel T. 1998. Olfactory and intranasal trigeminal event-related potentials in anosmic patients. *The Laryngoscope*, 108(7):1033–1035 DOI: 10.1097/00005537-199807000-00015.
- Kobal G, Hummel T. 2001. Olfactory Event-Related Potentials. In: Simon S, Nicolelis M (Hrsg) *Methods in Chemosensory Research*. CRC Press DOI: 10.1201/9781420038729.ch17.
- Kobal G, Hummel T, Van Toller S. 1992. Differences in human chemosensory evoked potentials to olfactory and somatosensory chemical stimuli presented to left and right nostrils. *Chem Senses*, 17(3):233–244 DOI: 10.1093/chemse/17.3.233.
- Kobal G, Plattig KH. 1978. [Objective olfactometry: methodological annotations for recording olfactory EEG-responses from the awake human]. *EEG EMG Z Elektroenzephalogr Elektromyogr Verwandte Geb*, 9(3):135–145.
- Kromer J, Hummel T, Pietrowski D, Giani AS, Sauter J, Ehninger G, Schmidt AH, Croy I. 2016. Influence of HLA on human partnership and sexual satisfaction. *Sci Rep*, 6(1):32550 DOI: 10.1038/srep32550.
- Lapid H, Hummel T. 2013. Recording Odor-Evoked Response Potentials at the Human Olfactory Epithelium. *Chem Senses*, 38(1):3–17 DOI: 10.1093/chemse/bjs073.
- Lapid H, Seo H-S, Schuster B, Schneidman E, Roth Y, Harel D, Sobel N, Hummel T. 2009. Odorant Concentration Dependence in Electroolfactograms Recorded From the Human Olfactory Epithelium. *J Neurophysiol*, 102(4):2121–2130 DOI: 10.1152/jn.91321.2008.
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, S PC, Maul-Pavicic A, Jäger M, Li X-H, Breer H, Zufall F, Boehm T. 2004. MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science*, 306(5698):1033–1037 DOI: 10.1126/science.1102818.
- Leinders-Zufall T, Lane AP, Puche AC, Ma W, Novotny MV, Shipley MT, Zufall F. 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature*, 405(6788):792–796 DOI: 10.1038/35015572.
- Leopold DA, Hummel T, Schwob JE, Hong SC, Knecht M, Kobal G. 2000. Anterior Distribution of Human Olfactory Epithelium: *The Laryngoscope*, 110(3):417–421 DOI: 10.1097/00005537-200003000-00016.
- Lloyd-Thomas A, Keverne EB. 1982. Role of the brain and accessory olfactory system in the block to pregnancy in mice. *Neuroscience*, 7(4):907–913 DOI: 10.1016/0306-4522(82)90051-3.
- Lotsch J. 2004. A Simple and Reliable Method for Clinical Assessment of Odor Thresholds. *Chem Senses*, 29(4):311–317 DOI: 10.1093/chemse/bjh034.
- Lötsch J, Hummel T. 2006. The clinical significance of electrophysiological measures of olfactory function. *Behav Brain Res*, 170(1):78–83 DOI: 10.1016/j.bbr.2006.02.013.
- Lüllmann-Rauch R, Paulsen F. 2012. Geruchs- und Geschmacksorgane. In: *Taschenlehrbuch Histologie*:

- 10 Tabellen. Thieme, Stuttgart, S. 583–586.
- Milinski M. 2001. Evidence for MHC-correlated perfume preferences in humans. *Behav Ecol*, 12(2):140–149 DOI: 10.1093/beheco/12.2.140.
- Milinski M, Croy I, Hummel T, Boehm T. 2013. Major histocompatibility complex peptide ligands as olfactory cues in human body odour assessment. *Proc R Soc B Biol Sci*, 280(1755):20122889 DOI: 10.1098/rspb.2012.2889.
- Milinski M, Griffiths SW, Reusch TBH, Boehm T. 2010. Costly major histocompatibility complex signals produced only by reproductively active males, but not females, must be validated by a ‘maleness signal’ in three-spined sticklebacks. *Proc R Soc B Biol Sci*, 277(1680):391–398 DOI: 10.1098/rspb.2009.1501.
- Monti-Bloch L, Grosser BI. 1991. Effect of putative pheromones on the electrical activity of the human vomeronasal organ and olfactory epithelium. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 39(4B):573–582 DOI: 10.1016/0960-0760(91)90255-4.
- Müller A, Landis BN, Zahnert T, Reichmann H, Hummel T. 2005. Riechen: Normale Funktion und Störungen. *Aktuelle Neurol*, 32(1):15–27 DOI: 10.1055/s-2004-834578.
- Mungall AJ, Palmer SA, Sims SK. 2003. The DNA sequence and analysis of human chromosome 6. *Nature*, 425(6960):805–811 DOI: 10.1038/nature02055.
- Murphy K, Weaver C. 2018. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg DOI: 10.1007/978-3-662-56004-4.
- Natsch A. 2014. A human chemosensory modality to detect peptides in the nose? *Proc R Soc B Biol Sci*, 281(1776):20131678 DOI: 10.1098/rspb.2013.1678.
- Ohloff G, Pickenhagen W, Kraft P. 2012. *Scent and chemistry: the molecular world of odors*. New and rev. ed. Verlag Helvetica Chimica Acta ; Wiley-VCH, Zürich : Weinheim.
- Okano M, Takagi SF. 1974. Secretion and electrogenesis of the supporting cell in the olfactory epithelium. *J Physiol*, 242(2):353–370 DOI: 10.1113/jphysiol.1974.sp010711.
- Osterhammel P, Terkildsen K, Zilstorff K. 1969. Electro-olfactograms in man. *J Laryngol Otol*, 83(7):731–733 DOI: 10.1017/s0022215100070894.
- Ottoson D. 1955. Analysis of the electrical activity of the olfactory epithelium. *Acta Physiol Scand Suppl*, 35(122):1–83.
- Pause BM, Sojka B, Krauel K, Ferstl R. 1996. The nature of the late positive complex within the olfactory event-related potential (OERP). *Psychophysiology*, 33(4):376–384 DOI: 10.1111/j.1469-8986.1996.tb01062.x.
- Pelosi P. 2001. The role of perireceptor events in vertebrate olfaction: *Cell Mol Life Sci*, 58(4):503–509 DOI: 10.1007/PL00000875.
- Penn DJ. 2002. The Scent of Genetic Compatibility: Sexual Selection and the Major Histocompatibility Complex. *Ethology*, 108(1):1–21 DOI: 10.1046/j.1439-0310.2002.00768.x.
- Penn DJ, Potts WK. 1999. The Evolution of Mating Preferences and Major Histocompatibility Complex

- Genes. *Am Nat*, 153(2):145–164 DOI: 10.1086/303166.
- Picton TW. 1988. The Endogenous Evoked Potentials. In: Başar E (Hrsg) *Dynamics of Sensory and Cognitive Processing by the Brain*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S. 258–265.
- Preti G, Wysocki CJ, Barnhart KT, Sondheimer SJ, Leyden JJ. 2003. Male axillary extracts contain pheromones that affect pulsatile secretion of luteinizing hormone and mood in women recipients. *Biol Reprod*, 68(6):2107–2113 DOI: 10.1095/biolreprod.102.008268.
- Rammensee H-G, Friede T, Stevanović S. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41(4):178–228 DOI: 10.1007/BF00172063.
- Rolls ET. 2004. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain Cogn*, 55(1):11–29 DOI: 10.1016/S0278-2626(03)00277-X.
- Rowe DJ. 2009. *Chemistry and technology of flavors and fragrances*. Blackwell ; CRC Press, Oxford; Boca Raton, Fla. [Aufruf am: 16.03.2020] URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9781444305517>.
- Rozenkrantz L, Weissgross R, Weiss T, Ravrebi I, Frumin I, Shushan S, Gorodisky L, Reshef N, Holzman Y, Pinchover L, Endevelt-Shapira Y, Mishor E, Furman-Haran E, Carp H, Sobel N. 2020. Unexplained Repeated Pregnancy Loss is Associated with Altered Perceptual and Brain Responses to Men's Body-Odor. *Physiology* DOI: 10.1101/2020.02.06.937029.
- Scheibe M, Zahnert T, Hummel T. 2006. Topographical differences in the trigeminal sensitivity of the human nasal mucosa: *NeuroReport*, 17(13):1417–1420 DOI: 10.1097/01.wnr.0000224764.61959.e8.
- Schmidt AH, Solloch UV, Baier D, Stahr A, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C. 2010. Regional differences in HLA antigen and haplotype frequency distributions in Germany and their relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens*, 76(5):362–379 DOI: 10.1111/j.1399-0039.2010.01520.x.
- Scott JW, Scott-Johnson PE. 2002. The electroolfactogram: a review of its history and uses. *Microsc Res Tech*, 58(3):152–160 DOI: 10.1002/jemt.10133.
- Singh PB, Brown RE, Roser B. 1987. MHC antigens in urine as olfactory recognition cues. *Nature*, 327(6118):161–164 DOI: 10.1038/327161a0.
- Spehr M. 2006. Essential Role of the Main Olfactory System in Social Recognition of Major Histocompatibility Complex Peptide Ligands. *J Neurosci*, 26(7):1961–1970 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4939-05.2006.
- Spehr M, Schwane K, Heilmann S, Gisselmann G, Hummel T, Hatt H. 2004. Dual capacity of a human olfactory receptor. *Curr Biol*, 14(19):R832–R833 DOI: 10.1016/j.cub.2004.09.034.
- Takagi SF, Shibuya T. 1959. 'On' - and 'Off' -responses of the olfactory epithelium. *Nature*, 184:60 DOI: 10.1038/184060a0.
- The MHC sequencing consortium. 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature*, 401(6756):921–923 DOI: 10.1038/44853.
- Wedekind C, Seebeck T, Bettens F, Paepke AJ. 1995. MHC-dependent mate preferences in humans.

- Proc Biol Sci, 260(1359):245–249 DOI: 10.1098/rspb.1995.0087.
- Welge-Lüssen A. 1999. Chemosensorisch evozierte Potentiale. *HNO*, 47(5):453–455 DOI: 10.1007/s001060050403.
- Witt M, Hansen A. 2008. Strukturelle und funktionelle Grundlagen des Riechens. In: Hummel T, Welge-Lüssen A, Czesnik D (Hrsg) *Riech- und Schmeckstörungen: Physiologie, Pathophysiologie und therapeutische Ansätze*; 14 Tabellen. Thieme, Stuttgart, S. 11–26.
- Witt M, Hummel T. 2006. Vomeronasal versus olfactory epithelium: is there a cellular basis for human vomeronasal perception? *Int Rev Cytol*, 248:209–259 DOI: 10.1016/S0074-7696(06)48004-9.
- Wobst B, Zavazava N, Luszyk D, Lange K, Ussat S, Eggert F, Ferstl R, Müller-Ruchholtz W. 1998. Molecular forms of soluble HLA in body fluids: potential determinants of body odor cues. *Genetica*, 104(3):275–283 DOI: 10.1023/a:1026487421626.
- Woelfing B, Traulsen A, Milinski M, Boehm T. 2009. Does intra-individual major histocompatibility complex diversity keep a golden mean? *Philos Trans R Soc B Biol Sci*, 364(1513):117–128 DOI: 10.1098/rstb.2008.0174.
- Yamazaki K, Boyse EA, Miké V, Thaler HT, Mathieson BJ, Abbott J, Boyse J, Zayas ZA, Thomas L. 1976. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J Exp Med*, 144(5):1324–1335 DOI: 10.1084/jem.144.5.1324.
- Yamazaki K, Singer A, Curran M, Beauchamp GK. 1999. Origin, Functions, and Chemistry of H-2 Regulated Odorants. In: Johnston RE, Müller-Schwarze D, Sorensen PW (Hrsg) *Advances in Chemical Signals in Vertebrates*. Springer US, Boston, MA, S. 173–180 DOI: 10.1007/978-1-4615-4733-4_13.
- Ziegler A, Dohr G, Uchanska-Ziegler B. 2002. Possible Roles for Products of Polymorphic MHC and Linked Olfactory Receptor Genes during Selection Processes in Reproduction*. *Am J Reprod Immunol*, 48(1):34–42 DOI: 10.1034/j.1600-0897.2002.01097.x.

13 Anhang

Anhang 1: Zertifikate der Analyse der Peptide durch Thermo Fisher.	68
Anhang 2: Amplituden in Korrelation im EOG.	77
Anhang 3: Latenzzeiten in Korrelation im EOG.	77
Anhang 4: tabellarische Übersicht der mittleren Werte mit Standardabweichung für die Amplitude (N1-P2) und der Latenzzeiten (L-P1: Reizbeginn bis P1, L-N1: Reizbeginn bis N1, L-P2: Reizbeginn bis P2) der OEPs im EEG.	78
Anhang 5: Kastengraphik Verteilung der Amplituden N1-P2 in μV der CSEPs für die Elektrodenposition Fz für die Reizklassen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau) und CO ₂ (grün).	79
Anhang 6: Kastengraphik Verteilung der Amplituden N1-P2 in μV der CSEPs für die Elektrodenposition Cz für die Reizklassen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau) und CO ₂ (grün).	79
Anhang 7: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der CSEPs im EEG für die Elektrodenposition Fz auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO ₂ (grün).	80
Anhang 8: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der CSEPs im EEG für die Elektrodenposition Fz auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO ₂ (grün).	80
Anhang 9: Wissenschaftliche Veröffentlichungen.	81
Anhang 10: Poster ECRO - Annual meeting 2019, Trieste.	Fehler! Textmarke nicht definiert.

ThermoFisher
SCIENTIFIC

The world leader
in serving science

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sequence:

[NH₂]SLLPAIVEL[COOH]

A^o 0201

Modification (s):

N/A

Project Number:

PA100919.1

Reference Number:

P6287-1

Peptide Name:

Seq1

Molecular Weight:

954.18

Amount:

15 mg

Additional Instruction (s):

N/A

Appearance:

White Powder

Storage:

-20 °C 1-12 months; -80 °C >1 year

Purity:

>98%

Mass Spectrum:

See attached

HPLC Enclosed:

See attached

Other Data:

No

Pierce Biotechnology
3747 N. Mendota Road

PO Box 117
Rockford, IL 61105
USA

(800) 874-3723
(815) 968-0747

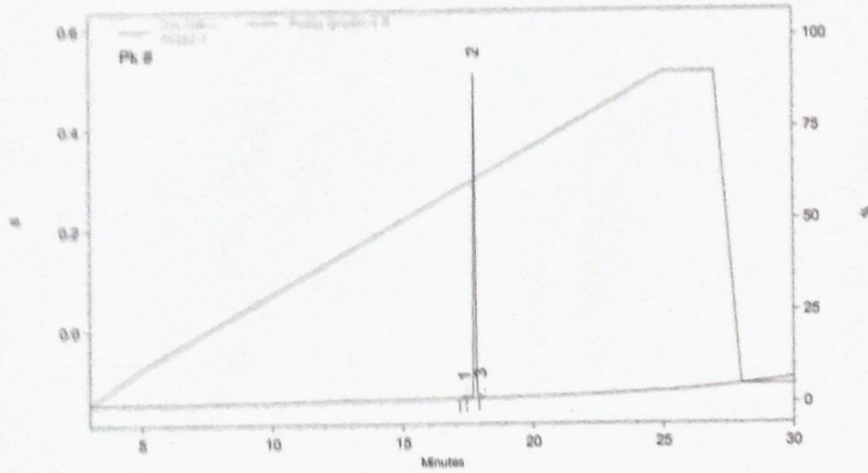
(815) 968-7316 fax
www.thermo.com/pierce

HPLC REPORT

Project: PA100819.1 MW: 954.18
 P6287-1

ID: Seq1
 P6287-1 15 mg
Thermo
SCIENTIFIC

Sample ID: P6287-1
 Data File: D:\32Karat\Projects\Default\P6287-1
 Method: D:\32Karat\Projects\Default\Methods\ANAPEP1_AA.met
 Column: C18, 5um, 100x3.00MM,
 Solvent: Solvent A: 0.1% TFA in H2O; Solvent B: 0.08% TFA in ACN
 Wavelength: 20 nm
 HPLC ID# CD-075 EQ-026



PK #	Retention Time	Height	Height Percent	Area	Area Percent
1	17.367	3675	0.557	23162	0.768
2	17.767	647953	98.235	2958086	98.026
3	17.967	7969	1.208	36409	1.207
Totals					
		659597	100.000	3017657	100.000

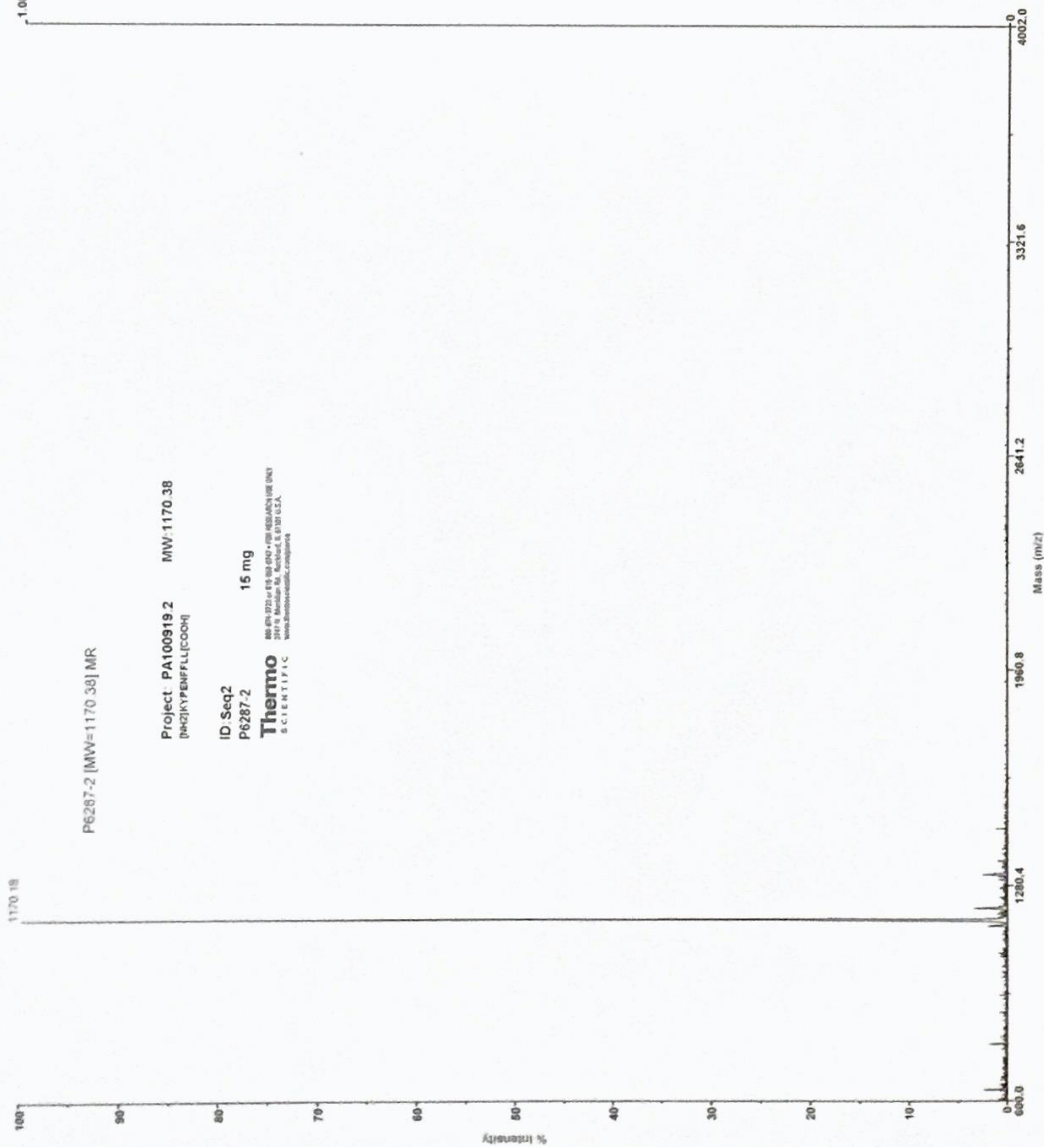
CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sequence: [NH₂]KYPENFFLL[COOH] A* 2402

Modification (s): N/A
Project Number: PA100919.2
Reference Number: P6287-2
Peptide Name: Seq2
Molecular Weight: 1170.38
Amount: 15 mg
Additional Instruction (s): N/A
Appearance: White Powder
Storage: -20 °C 1-12 months; -80 °C >1 year
Purity: >99%
Mass Spectrum: See attached
HPLC Enclosed: See attached
Other Data: No

AB SCIEX Voyager System 6407

Voyager Spec #1=>SMS[BP = 1170.2, 10.443]



Project: PA100919.2 MW: 1170.38
[PHZIKYENFLLJCOOH]

ID: Seq2
P6287-2 15 mg

Thermo
MADISON, WI 53705-5080
5070 Lincoln Ave., Madison, WI 53705 U.S.A.
www.thermo.com

Mode of operation: Linear
Extraction mode: Delayed
Polarity: Negative
Acquisition control: Manual
Accelerating voltage: 20000 V
Grid voltage: 95%
Guide wire 0: 0.05%
Extraction delay time: 300 nsec
Acquisition mass range: 600 -- 4000 Da
Number of laser shots: 100/spectrum
Laser intensity: 1076
Laser Rep Rate: 3.0 Hz
Calibration type: Default
Calibration matrix: a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Low mass gate: Off
Digitizer start time: 16.817
Bin size: 1 nsec
Number of data points: 26420
Vertical scale: 200 mV
Vertical offset: 0%
Input bandwidth: 500 MHz
Sample well: 43
Plate ID: 100 SS
Serial number: 6407
Instrument name: Voyager-DE PRO
Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well plate.pit
Lab name:
Absolute x-position: 10843.1
Absolute y-position: 26533.9
Relative x-position: -904.354
Relative y-position: -453.649
Shots in spectrum: 100
Source pressure: 4.158e-007
Mirror pressure: 9.175e-008
TC2 pressure: 0.01604
TIS gate width: 30
TIS flight length: 678

Acquired: 10:38:00, July 14, 2017

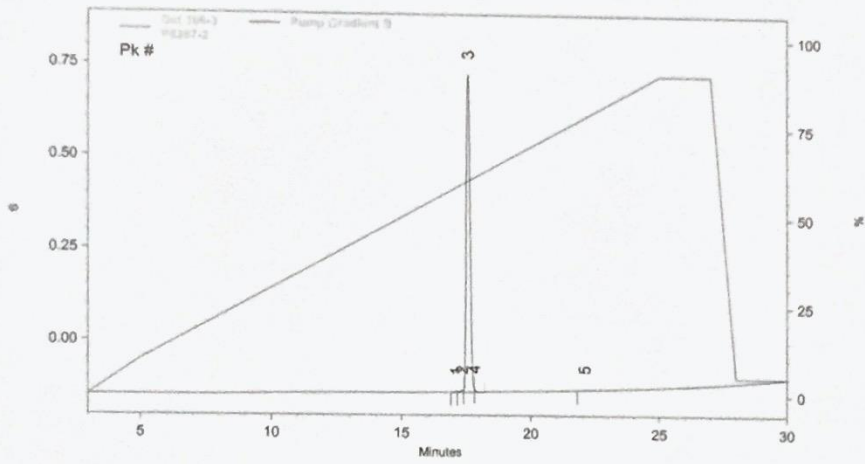
Printed: 10:38, July 14, 2017

HPLC REPORT

Sample ID: P6287-2
 Data File: D:\32Karat\Projects\Default\P6287-2
 Method: D:\32Karat\Projects\Default\Methods\ANAPEP1_AA.met
 Column: C18, 5um, 100X3.00MM,
 Solvent: Solvent A: 0.1% TFA in H2O; Solvent B: 0.08% TFA in ACN
 Wavelength: 20 nm
 HPLC ID# CD-075 EQ-026

Project: PA100919.2 MW:1170.38
 [N6]KYRPFLL[COOH]

ID: Seq2
 P6287-2 15 mg
Thermo
 SCIENTIFIC
800-FR-010 or 1-800-875-5100 • FOR RESEARCH USE ONLY
 511 N. Lincoln St., Madison, WI 53705 U.S.A.
 www.thermo.com/usa/seq2



Pk #	Retention Time	Height	Height Percent	Area	Area Percent
1	17.100	1856	0.211	9841	0.112
2	17.333	4827	0.550	38340	0.438
3	17.567	864657	98.506	8680706	99.147
4	17.817	6037	0.688	20852	0.238
5	22.083	395	0.045	5646	0.064
Totals					
		877772	100.000	8755385	100.000

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sequence: [NH₂]KAPENFFLA[COOH]

Modification (s): N/A

Project Number: PA100919.3

Reference Number: P6287-3

Peptide Name: Seq3 1 *Kontrollpeptid für* 2 *!*

Molecular Weight: 1036.20

Amount: 15 mg

Additional Instruction (s): N/A

Appearance: White Powder

Storage: -20 °C 1-12 months; -80 °C >1 year

Purity: >98%

Mass Spectrum: See attached

HPLC Enclosed: See attached

Other Data: No

AB SCIEX Voyager System 6407

Voyager Spec #1=>SMS[BP = 1036.3, 29869]



Project: PA100919.3 MW: 1036.20
[P62]KAP[FLACOOH]

ID Seq3
P6287-3 15 mg
Thermo
3019, Madison St., Billerica, MA 01821, U.S.A.
SCIENTIFIC INSTRUMENTS CORPORATION

Mode of operation: Linear
Extraction mode: Delayed
Polarity: Positive
Acquisition control: Manual
Accelerating voltage: 20000 V
Grid voltage: 95%
Guide wire 0: 0.05%
Extraction delay time: 300 nsec
Acquisition mass range: 600 -- 4000 Da
Number of laser shots: 100/spectrum
Laser intensity: 914
Laser Rep Rate: 3.0 Hz
Calibration type: Default
Calibration matrix: a-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Low mass gate: Off
Digitizer start time: 16.818
Bin size: 1 nsec
Number of data points: 26421
Vertical scale: 200 mV
Vertical offset: 0%
Input bandwidth: 500 MHz
Sample well: 04
Plate ID: 100 SS
Serial number: 6407
Instrument name: Voyager-DE PRO
Plate type filename: C:\VOYAGER\100 well plate pit
Lab name:
Absolute x-position: 16777.8
Absolute y-position: 47893.7
Relative x-position: -49.6895
Relative y-position: 586.229
Shots in spectrum: 100
Source pressure: 3.63e-007
Mirror pressure: 6.413e-008
TC2 pressure: 0.01607
TIS gate width: 30
TIS flight length: 678

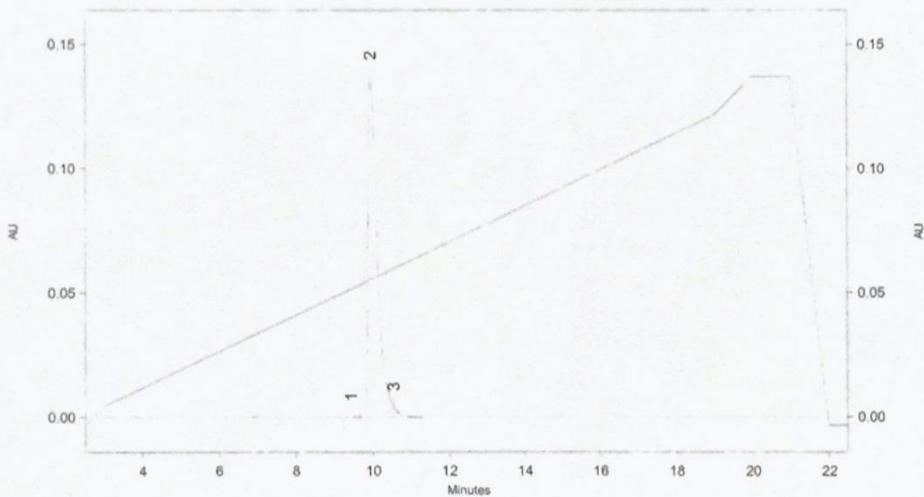
Acquired: 15:30:00, July 14, 2017

Printed: 15:31, July 14, 2017

HPLC REPORT

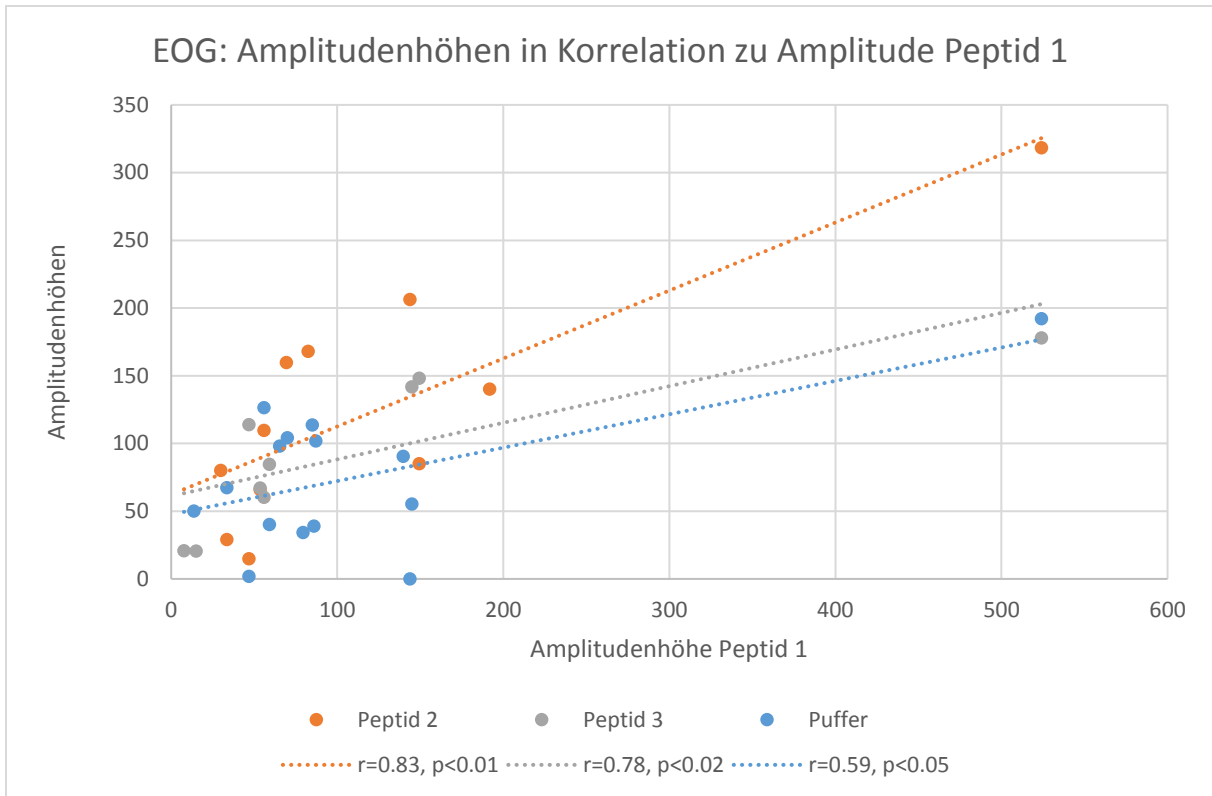
Sample ID: P6287-3
 Method: D:\32Karat\Methods\Monolithic_1.met
 File Name: D:\32Karat\Projects\Default\Data\P6287-3
 Column: Monolithic C18 100X3mm, 120A, Flow Rate: 1ml min.
 Wavelength: 220nm
 HPLC ID#: CD-069

Project: PA100919.3 MW:1036.20
 [R42]KAPENFLA(COOH)
 ID: Seq3
 P6287-3 15 mg
Thermo SCIENTIFIC
888-874-3737 or 915-884-6347 • FOR RESEARCH USE ONLY
 2717 N. Milliken Rd., Foster, IL 61181 U.S.A.
 www.thermo.com/usa/pep

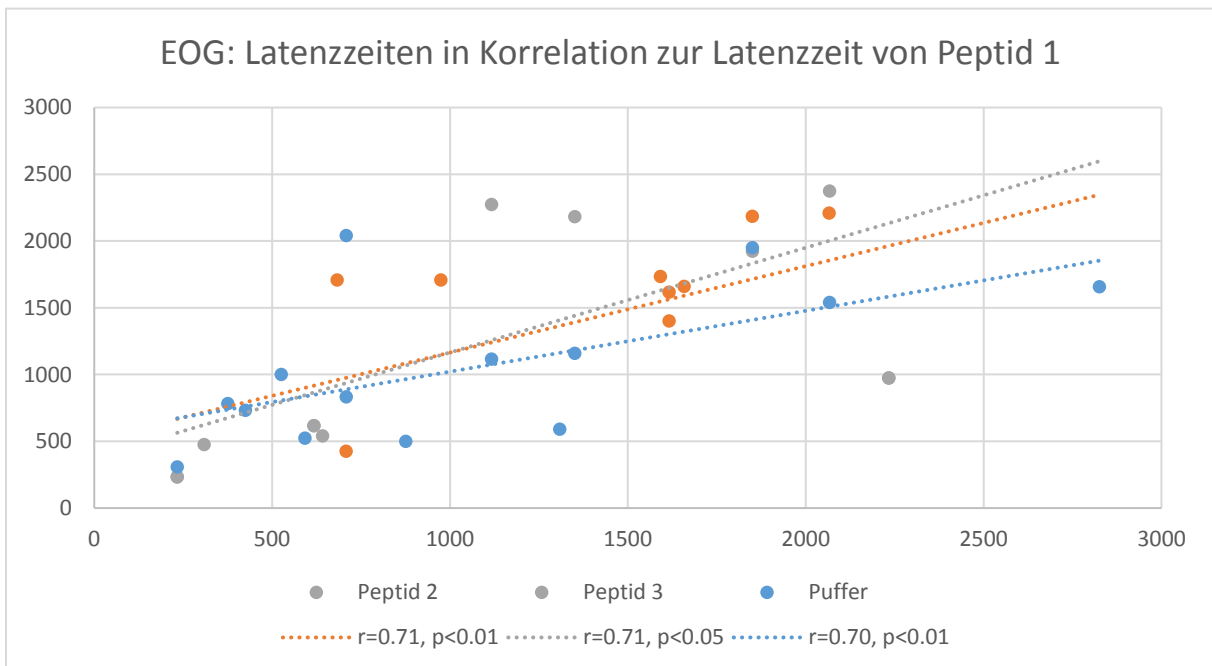


Pk #	Retention Time	Area	Area Percent
1	9.417	3645	0.155
2	9.950	2306403	98.306
3	10.533	36107	1.539

Totals		2346155	100.000
--------	--	---------	---------



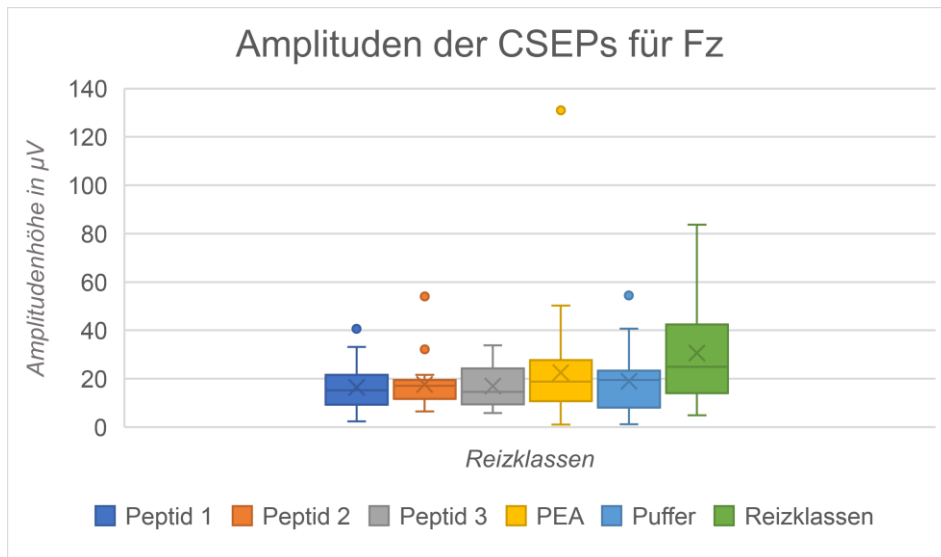
Anhang 2: Amplituden in Korrelation im EOG.



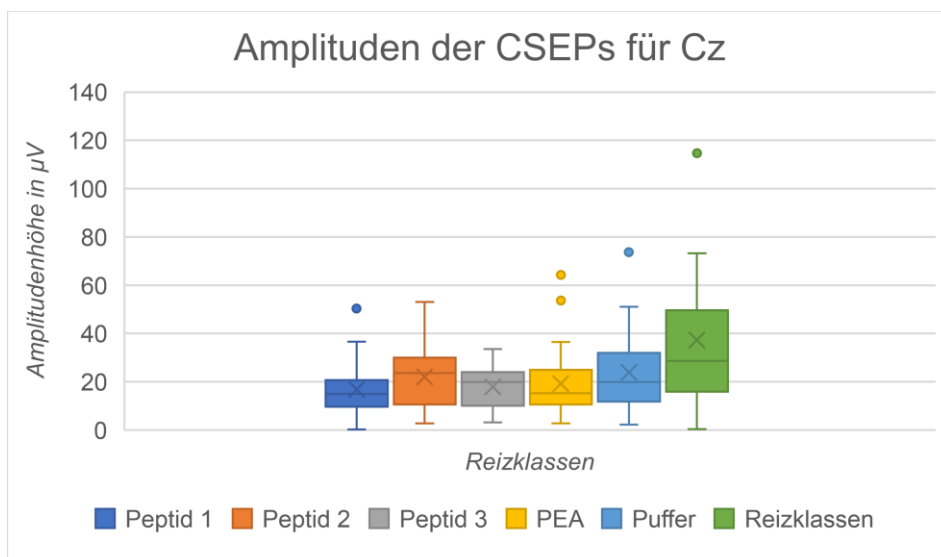
Anhang 3: Latenzzeiten in Korrelation im EOG.

Anhang 4: tabellarische Übersicht der mittleren Werte mit Standardabweichung für die Amplitude (|N1-P2|) und der Latenzzeiten (L-P1: Reizbeginn bis P1, L-N1: Reizbeginn bis N1, L-P2: Reizbeginn bis P2) der OEPs im EEG.

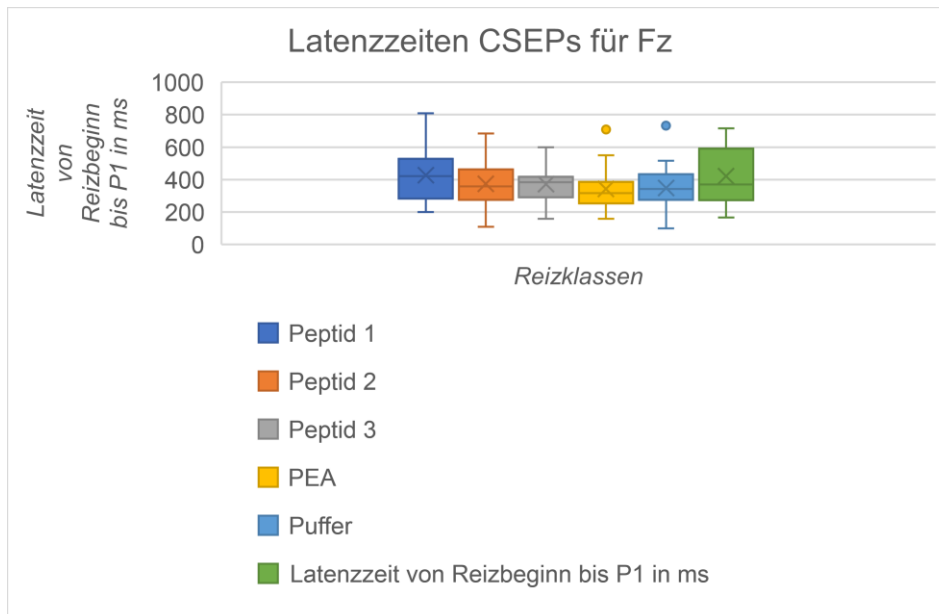
	N1-P2	N1-P2	N1-P2	L-P1	L-P1	L-P1	L-N1	L-N1	L-N1	L-P2	L-P2	L-P2
	Pz	Fz	Cz	Pz	Fz	Cz	Pz	Fz	Cz	Pz	Fz	Cz
Peptid 1	19.02	16.38	16.85	434.47	427.65	434.47	533.33	524.24	520.83	751.13	770.08	756.43
SD±	15.61	9.71	11.83	175.20	164.98	175.20	174.27	176.02	170.95	134.45	156.70	155.32
Peptid 2	20.85	17.63	22.05	268.86	373.41	368.86	474.99	489.68	481.25	707.90	709.52	698.75
SD±	10.24	10.09	12.07	113.29	136.99	116.40	119.54	138.44	132.48	131.37	128.83	128.28
Peptid 3	21.96	16.97	17.82	367.42	372.82	380.33	465.15	461.23	484.67	685.61	682.61	705.00
SD±	9.15	8.23	8.02	134.31	118.07	143.10	126.11	127.89	147.95	122.86	124.34	147.20
PEA	26.43	22.52	19.18	343.81	342.65	351.66	456.99	457.35	457.80	684.14	683.58	665.05
SD±	34.89	22.17	13.29	134.32	137.78	150.76	140.67	142.63	146.26	121.27	120.26	129.59
Puffer	29.19	19.00	23.90	351.31	348.68	341.67	478.50	462.72	454.58	674.12	673.25	677.5
SD±	36.48	13.32	16.69	162.74	147.28	143.73	158.07	140.53	138.93	142.56	141.79	159.47
Lösungsmittel	37.79	30.66	37.29	433.33	422.22	422.22	532.87	525.46	504.16	801.85	788.43	776.85
SD±	29.31	22.15	28.47	181.69	178.844	188.04	203.27	191.45	213.94	158.23	147.78	166.02



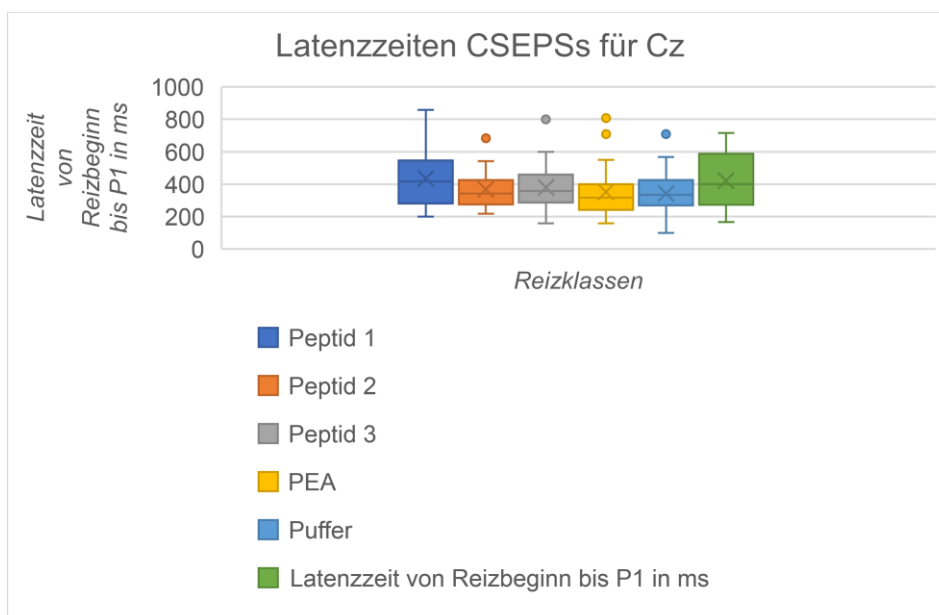
Anhang 5: Kastengraphik Verteilung der Amplituden $|N1-P2|$ in μV der CSEPs für die Elektrodenposition Fz für die Reizklassen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau) und CO₂ (grün).



Anhang 6: Kastengraphik Verteilung der Amplituden $|N1-P2|$ in μV der CSEPs für die Elektrodenposition Cz für die Reizklassen Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau) und CO₂ (grün).



Anhang 7: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der CSEPs im EEG für die Elektrodenposition Fz auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün).



Anhang 8: Kastengraphik Verteilung der Latenzzeiten (Reizbeginn bis P1) in ms der CSEPs im EEG für die Elektrodenposition Cz auf die 6 Reizklassen des Olfaktometers: Peptid 1 (blau), Peptid 2 (orange), Peptid 3 (grau), PEA (gelb), Puffer (hellblau), CO₂ (grün).

Anhang 9: Wissenschaftliche Veröffentlichungen.

Poster Präsentation: ECRO-Annual meeting September 2019, Trieste

Recordings of electro-olfactograms from the human olfactory epithelium in response to HLA-related Peptides

Vortrag: Jahrestagung der Arbeitsgesellschaft Olfaktologie/Gustologie der Deutschen Gesellschaft für HNO Dezember 2019, Dresden

Recordings of electro-olfactograms from the human olfactory epithelium in response to HLA-related peptides